

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

Die Bedeutung der Gallensalzrezeptoren S1PR2 und TGR5 bei Cholangiokarzinomen

Dissertation

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

vorgelegt von

Justin Jung

Düsseldorf, 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. Verena Keitel-Amselmino

Zweitgutachter/in: PD Dr. Nadine Lübke

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Ziel dieser Arbeit.....	1
3	Material und Methoden.....	2
3.1	Material	2
3.2	Methoden	5
4	Ergebnisse.....	13
4.1	Charakterisierung der neuen anti-S1PR2 Antikörper	13
4.2	Untersuchungen zur mRNA Expression von S1PR2 und TGR5 in verschiedenen Zelllinien	17
4.3	Detektion von S1PR2 auf Proteinebene	20
4.4	Funktionelle Untersuchungen zu S1PR2 und TGR5	26
4.5	Detektion von S1PR2 und TGR5 im humanen Cholangiokarzinomgewebe	32
5	Diskussion.....	40
5.1	S1PR2 wird von Cholangiozyten und Cholangiokarzinomzelllinien exprimiert	40
5.2	TGR5-Defizienz bewirkt eine Induktion der S1PR2 mRNA Expression.....	41
5.3	Bedeutung von S1PR2 und TGR5 beim Cholangiokarzinom	41
5.4	Ausblick.....	42
6	Zusammenfassung	44
7	Summary.....	45
8	Literaturverzeichnis	46
9	Abkürzungsverzeichnis.....	51
10	Abbildungsverzeichnis.....	53
11	Tabellenverzeichnis	54

1 Einleitung

1.1 Das Cholangiokarzinom

Das Cholangiokarzinom (CCC) stellt eine aggressive, meist tödliche, maligne Krankheit der Gallenwege mit nur begrenzten Therapieoptionen dar [1].

Anatomisch unterscheidet man das mit 80-90% häufigere extrahepatische von dem mit 5-10% seltenerem intrahepatischen Cholangiokarzinom [2, 3]. Dabei untergliedert man das extrahepatische CCC weiter in die in 60-70% vorliegende Form, bei der die Bifurkation des Ductus hepaticus communis betroffen ist (auch Klatskin-Tumor genannt) und in die in 20-30% vorliegende Form, bei der der distale DHC betroffen ist [3]. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass die Cholangiozyten und damit das biliäre Epithel den Ursprung des Cholangiokarzinoms darstellen [4]. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass sich das extrahepatische Cholangiokarzinom auch aus peribiliären Drüsen entwickeln kann [5], welche einen Anschluss an das extrahepatische biliäre System haben [5] und eine biliäre Stammzellnische [5] darstellen sollen. Auch wird davon berichtet, dass das intrahepatische CCC aus transdifferenzierten Hepatozyten entstehen kann [6].

Histologisch sind über 90% der CCC Adenokarzinome [7] Untergruppen wie das papilläre, muzinöse oder das Adenokarzinom vom intestinalen Typ [7]. Diese beschreibenden Untergruppierungen werden ergänzt von beschreibenden Wachstumsmustern wie periduktal-infiltrierend, papillär oder raumfordernd [2]. Das intrahepatische CCC wird zumeist als raumfordernd („Mass forming“) beschrieben [6]. Auch finden sich im Sinne einer klassischen Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz [8] zwei histologische Vorstufen des CCC mit der biliären intraepithelialen Neoplasie und der papillären intraduktalen Neoplasie [9]. Auch die desmoplastische Umgebungsreaktion gewinnt in Bezug auf Progression, Invasion, Metastasierung, Immunsuppression und Resistenz gegenüber Chemotherapien sowie gezielten Therapien an Relevanz [6].

Das mediane Erkrankungsalter liegt in westlichen Nationen bei ungefähr 65 Jahren [2]. Während Männer leicht häufiger betroffen sind als Frauen [10], zeigt sich keine klare ethnische Präferenz der Erkrankung [3], obwohl in den USA bei nach Alter adjustierten Prävalenzen höhere Erkrankungsraten bei Personen lateinamerikanischer Herkunft (1,22/100.000 pro Jahr) und niedrigere Erkrankungsraten bei Personen afroamerikanischer Herkunft zu beobachten sind (0,17-0,5/100.000 pro Jahr) [2].

Die Risikofaktoren bzw. assoziierten Faktoren des CCC unterscheiden sich deutlich in ihrer geographischen Verteilung [11-13] und gliedern sich in folgende Kategorien: Chronische

Inflammation, Cholangitis, oxidativer Stress, Defekte in Zellreperaturmechanismen [11, 12], Cholestase mit Akkumulation von Gallensäuren [11], kongenitale Abnormalitäten [3] und Exposition gegenüber Toxinen [2].

Unter chronischer Inflammation lassen sich die Primär sklerosierende Cholangitis, Hepatolithiasis, parasitäre hepatobiliäre Infektionen [4], nicht-alkoholische Steatohepatitis/metabolische Dysfunktions-assoziierte Lebererkrankung (NASH/MASLD), autoimmune Hepatitiden [6], aber auch die Risikofaktoren wie Hepatitis B und C [3], Adipositas, Diabetes und Alkoholkonsum [12-14] eingliedern.

Ohne auf zu viele Faktoren einzugehen, sind Besonderheiten hervorzuheben. Zum einen der häufigste Risikofaktor in der westlichen Welt [3] die PSC, die hauptsächlich zu einem extrahepatischen CCC führt [14] und dies bereits in der Mehrheit der Fälle 2,5 Jahre nach der Diagnosestellung [2], sich in der Altersgruppe 30-50 Jahre und folglich deutlich früher präsentiert [3] und mit einem Lebenszeitrisko von 7-14% [5] heraussticht. Zum anderen die parasitären hepatobiliären Infektionen und insbesondere die Infektionen mit *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis* [2], welche beide den Mensch als Endwirt[10] über die Nahrungsaufnahme von ungekochtem Fisch befallen [3] und mit 7 Millionen Menschen mit Opisthorchiasis zu der höchsten Prävalenz weltweit von CCC (87 pro 100.000 pro Jahr) in Thailand [3] führen.

Manche der aufgeführten Unterpunkte lassen sich unter mehreren Oberpunkten eingliedern. Auch gilt Vorsicht, da auch das Tumorwachstum selbst durch tumor-bedingte Obstruktion der Gallenwege zu Cholestase führen kann [15]. Um die Aufzählung zu komplettieren, muss einschränkend gesagt werden, dass die meisten CCC sporadisch auftreten und damit die Genese mit keinem einzelnen Risikofaktor im Zusammenhang steht [1]. Darüber hinaus ist in den letzten Jahren eine Zunahme des intrahepatischen CCC zu beobachten, was möglicherweise auf die Zunahme metabolischer Risikofaktoren wie Diabetes, Adipositas und NAFLD/MASLD zurückzuführen ist [13, 16, 17].

Die Komplexität und Vielfalt der genannten Risikofaktoren, wie der Anatomie [9], Histologie, Inflammation [6], Ätiologie [5] und der ethnischen Abstammung [6] erklärt die große intra- und intertumorale Heterogenität [6] des CCC und somit des individuellen Tumormutationsprofils. Als Beleg dieser Variabilität liegen die am häufigsten im CCC gefundenen Mutationen im TP53 Gen und sind nur bei nahezu 35% aller CCC-Patienten zu finden [5]. Die heute durch zielgerichtete Therapien angehbaren Tumor-Treiber Mutationen im Wachstumsfaktor FGFR2 und der Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) finden sich in 9 bzw. 14% der intrahepatischen CCC [18].

Das CCC gewinnt aus zwei Gründen zunehmend an Bedeutung. Zum einen auf Grund der weltweit steigenden Inzidenz, die in der westlichen Welt bei 2,1 pro 100.000 Personen pro Jahr liegt [14]. In der genaueren Analyse im Zeitraum von 1973 bis 2012 in den USA scheint diese Steigerung vor Allem von dem intrahepatischen CCC (von 0,44 auf 1,18 pro 100.000 Personen pro Jahr) getragen zu sein, da die Inzidenz des extrahepatischen CCC eher leicht (auf 1,02 pro 100.000 Personen pro Jahr) gestiegen ist bzw. sich stabilisiert hat [6]. Zudem ist das CCC mit 10-15% die zweithäufigste primär hepatische maligne Neoplasie [11, 19] und der Anteil an allen gastrointestinalen Tumoren weltweit liegt insgesamt bei circa 3% [4]. Zum anderen finden sich insbesondere beim intrahepatischen CCC bei 20-30% der Betroffenen therapeutisch angehbare Treibermutationen, die eine personalisierte Therapieoption in der palliativen Situation ermöglichen [20] [18].

Klinisch ist die Symptomatik abhängig von der anatomischen Lokalisation. Das extrahepatische CCC zeigt als späte Komplikation der biliären Obstruktion den schmerzlosen Ikterus, eine Entfärbung des Stuhls, dunklen Urin und Juckreiz. Während das intrahepatische CCC wiederum erst spät durch nur unspezifische Zeichen wie die Malaise, Gewichtsverlust oder Bauchschmerzen symptomatisch wird [3].

Um die Diagnostik vereinfacht zu skizzieren, wird diese schrittweise dargestellt.

Zu Beginn führt die Kombination aus klinischer Expertise und Bildgebung zu dem Verdacht auf ein CCC. Wobei die radiologische Diagnose auf der Basis von kontrastmittelgestütztem Ultraschall, kontrastmittelgestützter Computertomographie, kontrastmittelgestützter Magnetresonanztomographie oder deren Kombination beruht [14].

In Ergänzung dazu wird anschließend eine Biopsie bzw. Zytologie zur histologischen Bestätigung angestrebt. Auch hier bei der Probenentnahme ist eine Bildgebung ob Ultraschall oder Computertomographie von Bedeutung [14]. Bereits an diesem Punkt stellen mehrere Alternativdiagnosen, wie benigne Strikturen oder IgG4-assoziierte Cholangitiden, eine Herausforderung dar [3]. Um diese Alternativdiagnosen auszuschließen, kann z.B. nach einer Bürstenzytologie in einer endoskopisch retrograde Cholangiographie (ERD) die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit Methoden der digitalen Bildanalyse den diagnostischen Mehrwert steigern [8].

Nach der histologischen Bestätigung erfolgt das Staging durch die Radiologie wiederum mittels Bildgebung durch meist kontrastmittelgestützte Computertomographie, kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomographie oder auch 18Fluorodeoxyglukose-Positron-Emissions-Tomographie (18FDG-PET), um die genaue Ausbreitung bzw. mögliche bestehende Metastasierung festzustellen.

Insgesamt hat jedes diagnostische Verfahren Vor- und Nachteile, die hier nicht diskutiert werden sollen. Teilweise erfolgt das endgültige Staging erst mittels explorativer Laparoskopie und kann so unnötige Laparotomien vermeiden [8]. Auch wenn die flexible Cholangioskopie mit intraduktalem Ultraschall technisch verfügbar ist, ist sie bisher noch kein Teil der Standarddiagnostik [2].

Ziel der Diagnostik ist u.a. festzustellen, ob der Tumor resektabel ist, denn die einzigen potenziell verfügbaren Möglichkeiten zur Heilung vom CCC sind die chirurgische Resektion oder in Ausnahmefällen eine Lebertransplantation [11].

Die chirurgische Resektion sollte auch nur in kurativer Absicht durchgeführt werden, da es für eine palliative chirurgische Resektion keine Evidenz über eine palliative konservative Behandlung hinaus gibt [2]. Die chirurgische Therapie besteht im Falle eines extrahepatischen, den distalen DHC betreffenden, CCCs in der Pankreatikoduodenektomie nach Whipple-Kausch mit einem 5-Jahres-Überleben von 20-40% in einer R0-Situation [8]. Wenn die hiläre Bifurkation des Ductus hepaticus communis betroffen ist (ein Klatskin-Tumor vorliegt), muss häufig auch eine partielle Hepatektomie (häufig auch im Sinne einer Entfernung des Lobus caudatus) erfolgen [3]. Die Resektion eines intrahepatischen CCCs besteht in einer Lebersegmentektomie oder Lobektomie [2] und hat 5-Jahres-Überlebensraten von 22-44% korrelierend mit der R0-Resektion, dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen und einer Gefäßinvasion [2]. Operative Fortschritte wie die erweiterte Lobektomie, vaskuläre Rekonstruktionen oder Verfahren, um die verbleibende Leber bereits vor der Operation zu vergrößern, wie die Embolisierung der Vena portae, können in Fällen, die vorher als nicht resezierbar gegolten hätten, möglicherweise zu einer kurativen Therapie führen [21]. Nach einer operativen Entfernung bestimmen Faktoren wie die Komorbiditäten und eine Hyperbilirubinämie das Risiko des postoperativen Leberversagens, während der Ernährungsstatus und die Hypoalbuminämie das postoperative Outcome beeinflussen [3].

Basierend auf der BILCAP-Studie [22] wird Capecitabin als adjuvante Therapie sowohl in der deutschen als auch europäischen Leitlinie nach Resektion über einen Zeitraum von 6 Monaten empfohlen [23, 24].

Für stark selektierte Patienten mit *de novo* perihilärem, unresezierbarem oder auf einer PSC basiertem CCC kann eine Lebertransplantation, meist nach neoadjuvanter Radiochemotherapie [21] eine mögliche Therapiealternative darstellen [2]. Beispielsweise Patienten mit einem auf einer PSC basierten CCC haben im Falle einer chirurgischen Therapie mit einem 5-Jahres-Überleben von nur 10% eine bessere Prognose mit einer

Lebertransplantation [8]. In einer Studie der Mayo Clinic wurden 28 Patienten mit unresezierbaren hilären CCC in frühen Stadien mit negativer explorativer Laparoskopie hinsichtlich Lymphknotenmetastasen und nach neoadjuvanter Radiochemotherapie lebertransplantiert. Es wurde nach dieser neoadjuvanten Vortherapie ein mit der gesamten USA bei Lebertransplantationen vergleichbares 5-Jahres-Überleben von 82% festgestellt [3]. Basierend auf retrospektiven Kohortenanalysen ergab sich für Patienten mit PSC ein besseres Transplantations-freies Überleben, wenn die Patienten einem CCC Screening mittels MRT bzw. Ultraschall unterzogen wurden [25]. Daher wird für PSC seit kurzem ein mindestens einmal jährliches Screening auf ein CCC empfohlen [26].

Für die überwiegende Mehrheit (ca. 70-90%) der Patienten mit CCC steht bereits bei Diagnosestellung keine kurative Therapie zur Verfügung [7]. Bei diesen Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastatischem Krankheitsgeschehen [9] liegt das mediane Überleben mit der nicht kurativen [6] Standardchemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin bei 11,7 Monaten gegenüber 8,1 Monaten, wenn nur mit Gemcitabin behandelt wurde [27]. Durch Hinzunahme eines anti-PD-L1 Antikörpers (Durvalumab) zur Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin konnte ein mittleres Überleben von 12,7 Monaten erreicht werden, so dass die Dreifachkombination heute als Standardtherapie gilt [28].

Ergänzend zur medikamentösen palliativen Therapie besteht die Möglichkeit einer interventionellen palliativen Therapie mit z.B. der biliären Drainage mittels Carboplatin beschichteter Stents aus Plastik [7] oder mit der auf Grund der längeren Haltbarkeit und Kosteneffektivität genutzten Metallstents [3].

In den letzten Jahren hat sich das intrahepatische CCC zu einem Beispiel für Präzisionsmedizin entwickelt [18, 20]. Bei 20-30% der Patienten finden sich Tumor-assoziierte Mutationen, die zielgerichtet therapeutisch genutzt werden können und den Betroffenen selbst in der Zweitlinientherapie bei guter Verträglichkeit eine signifikante Lebensverlängerung ermöglichen [29] [30].

In der weiteren Einleitung wird anhand einer der o.g. Oberpunkte der Risikofaktoren, der Cholestase bzw. der Akkumulation von Gallensäuren, nach Einführung der relevanten Gallensalzrezeptoren, die bisher bekannte Rolle von Gallensalzrezeptoren beim CCC erläutert.

1.2 Gallensalzrezeptoren

Zum einen aktivieren Gallensäuren nukleäre Rezeptoren, die eine DNA-Bindungsdomäne haben und als Transkriptionsfaktoren dienen [31-34]. Dabei ist der Farnesoid X Rezeptor (FXR) als Prototyp für einen nukleären Rezeptor seit 1999 bekannt [35-38] und in Hepatozyten, in Enterozyten und schwach in Cholangiozyten exprimiert [39]. In diesen Zellen, die alle Kontakt mit Gallensäuren haben, reguliert FXR ein Netzwerk von Genen in der Synthese, Sekretion, Absorption und Aufnahme von Gallensäuren [32, 40] und in der Protein- und Glykogensynthese [41]. Auf diese Weise vermittelt FXR auch einen Schutz vor oxidativem Stress, Hyperplasie [42] und Inflammation [43]. Ein Knockout von FXR hingegen führt bei Mäusen, die einen normalen Phänotyp haben [40], zu einer dysregulierten Gallensäuresynthese, einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis, einem hepatozellulären Karzinom [44] und auch zu einem CCC [42]. Neben FXR aktivieren Gallensäuren weitere nukleäre Rezeptoren wie den Vitamin D Rezeptor (VDR) und den Pregnane X Rezeptor (PXR) [45-47].

Zum anderen wurde TGR5 im Jahr 2002 erstmals als membranständiger G-Protein gekoppelter Rezeptor beschrieben [48, 49]. Weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die von Gallensäuren aktiviert werden, sind der S1PR2 Rezeptor und verschiedene muskarinerge (Acetylcholin) Rezeptoren [1, 31, 50].

1.2.1 S1PR2 Rezeptor

Der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-2 (S1PR2 Rezeptor) nimmt eine Schlüsselrolle in der Stimulation von Zellwachstum beim Cholangiokarzinom ein [33], da er mit der Aktivierung der Signalwege von ERK1/2 und der Serin-Threonin-Proteinkinase (AKT) wichtig ist für Zellproliferation, Invasion und Chemotherapieresistenz des CCC [1].

Der S1PR2 Rezeptor ist ein 7-Transmembran G-Protein-gekoppelter Rezeptor [51], der beim Menschen auf dem Chromosom 19p13.2 lokalisiert ist, 353 Aminosäuren umfasst und so ein Molekulargewicht von ca. 39 kDa erreicht [51].

Insgesamt ist der S1PR2 Rezeptor einer von fünf Sphingosin-1-Phosphat(S1P)-Rezeptoren und ist ubiquitär exprimiert [52]. Zudem ist er von den fünf Rezeptoren derjenige, der am häufigsten in Cholangiozyten [4], in Cholangiokarzinomzellen und in Hepatozyten vorkommt [46]. Eine besonders hohe S1PR2 Rezeptor Expression konnte im humanen und murinen Cholangiokarzinomgewebe und Cholangiokarzinomzelllinien nachgewiesen werden [31].

Nach Stimulation mit konjugierten Gallensäuren triggert S1PR2 in CCC Zelllinien ERK vermittelt die Zellproliferation und fördert die Invasivität der Tumorzellen [1].

Jedes Organ bzw. Gewebe exprimiert die verschiedenen S1P Rezeptoren in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation unterschiedlich und die Expressionslevel variieren je nach Dignität (benigne vs. maligne) [53].

Die Funktion von S1PR2 ist zelltyp-spezifisch [4] und ins Besondere in Bezug auf verschiedene Krebsarten davon abhängig, in welchem Zelltyp der S1PR2 Rezeptor mit welchen G-Proteinen interagiert [11].

Neben den bereits genannten Funktionen des S1PR2 Rezeptors in Bezug auf das CCC werden dem Rezeptor mit der Relevanz für Zellüberleben und -tod [54], bei der Heilungsantwort beim akuten Leberversagen [55] und bei der Förderung von Metastasierung [51] weitere Funktionen zugeschrieben.

Die Liganden für den S1PR2 Rezeptor sind Sphingosin-1-Phosphat (S1P) [56] und konjugierte Gallensäuren, nicht jedoch unkonjugierte Gallensäuren [57]. S1P kann sowohl intrazellulär [52], als auch extrazellulär über einen auto- oder parakrinen Weg [58] wirken und ist ein potentes, bioaktives Sphingolipid, welches in einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Zellproliferation, Differenzierung, Motilität, Angiogenese, Inflammation und maligner Transformation involviert ist [59]. Die konjugierten Gallensäuren Taurocholsäure (TCA), Taurodeoxycholsäure (TDCA), Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA), Glykocholsäure und Glykodeoxycholsäure aktivieren ausschließlich S1PR2 und keinen anderen der S1P Rezeptoren [40].

Somit ist der S1PR2 Rezeptor der einzige S1P Rezeptor, an den TCA binden kann [57]. An diesem bindet TCA mit einer niedrigen Affinität über eine Wasserstoffbrückenbindung an Leucin173 [57]. Während die TGR5 Expression in Vorarbeiten nicht von TCA beeinflusst wird, steigt die S1PR2 Expression induziert durch TCA [40].

TCA aktiviert in vitro dosisabhängig mit einer Sättigung ab einer Konzentration von 50-100µM [57] das AKT und ERK1/2 signaling in humanen Cholangiokarzinomzellen und stimuliert so die Proliferation, Inflammation, Migration und Invasion in Cholangiokarzinomzellen [11, 40]. Aus diesem Grund gilt TCA als co-karzinogen und nicht als direkt kanzerogen [15]. Zusätzlich an Relevanz gewinnt TCA, da Patienten mit einem Cholangiokarzinom gegenüber Patienten mit benignen Gallengangserkrankungen erhöhte Level an konjugierten Gallensäuren in der Galle haben [11].

JTE013 (*1-[1,3-Dimethyl-4-(2-methylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-6-yl]-4-(3,5dichloro-4-pyridinyl)-semicarbazide* [56]) ist ein Pyrazoloipyridin-Derivat mit geringer Löslichkeit [46] und der meist verwendete chemische S1PR2 -Antagonist [50]. Es wurde zuerst 2001 im Central Pharmaceutical Institute in Japan synthetisiert [50].

Es sind keine Hinweise beschrieben, dass JTE-013 in einer Konzentration von 10 µM toxisch auf Cholangiokarzinomzellen wirkt [1]. Die mittlere inhibitorische Konzentration in Voruntersuchungen in vitro (IC 50) liegt bei 20 nM [56].

Bislang wurde in der Literatur die Wirkung von JTE-013 widersprüchlich dargelegt.

Einerseits wurde gezeigt, dass JTE-013 die von TCA induzierten AKT und ERK1/2-Signalwege in humanen und murinen Cholangiokarzinomzellen in vitro hemmt [31]. Andererseits hatte JTE-013 im Western Blot alleine bei Cholangiokarzinomzelllinien keinen Einfluss auf die Aktivierung der ERK/AKT Signalwege [19] und erst mit einem weiteren synergistisch-wirkenden Antagonisten einen Effekt [19].

Auch bezüglich einer inhibitorischen Wirkung von JTE-013 in Abwesenheit von TCA auf Cholangiokarzinomzellen wurden teils widersprüchliche Aussagen getroffen. Teils wurde wenig bis kein Effekt beschrieben [54] und teils ein inhibitorischer Effekt in einer Cholangiokarzinomzelllinie auch in Abwesenheit von TCA [1], was in diesem Fall einen autokrinen bzw. parakrinen Mechanismus vermuten lässt [4].

Im Gegensatz zu S1PR1 ist ein Knockout von S1PR2 nicht letal, jedoch entwickeln die Mäuse spontan auftretende Anfälle [60] und Fettlebern unter stark fetthaltiger Nahrung [31]. Interessanterweise entwickeln S1PR2 Knockout Mäuse nach einer Gallengangsligatur (BDL) einen deutlich weniger ausgeprägten Leberschaden als Kontrolltiere [46]. So wiesen S1PR2-defiziente Tiere weniger Inflammation und weniger Fibrose nach obstruktiver Cholestase auf [46].

1.2.2 TGR5 Rezeptor

Der TGR5 Rezeptor, der 2002 entdeckt [48] und 2003 charakterisiert [49] wurde, ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor und fördert die Proliferation und Anti-Apoptose [61] sowie die Migration und Invasion von Cholangiokarzinomen [62].

Der TGR5 Rezeptor ist ebenfalls ein Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen [48], umfasst 330 Aminosäuren [63] und ist beim Menschen auf dem Chromosom 2q35 kodiert [64].

Die Expression ist beinahe ubiquitär [63], jedoch bezogen auf die Leber ausschließlich in den nicht-parenchymalen Zellen wie den Cholangiozyten, Kupffer-Zellen, Sinusendothelzellen, aktivierten hepatischen Sternzellen sowie den Epithelzellen und glatten Muskelzellen der Gallenblase vorhanden [47, 65]. Im humanen bzw. murinen Cholangiozyten ist TGR5 neben der Plasma- und Zilienmembran auch im ER, in multivesikulären Körperchen, in Exosomen und in der nukleären Membran lokalisiert [39].

Die unterschiedlichen Kompartimente im Cholangiozyten bedingen sogar unterschiedliche Funktionen von TGR5, da der Rezeptor in Zilien mit dem Gi-Protein koppelt [64] und nicht mit einem Gs-Protein wie im Cholangiozyten außerhalb der Zilie, was bewirkt, dass der TGR5 Rezeptor sowohl proliferative, als auch antiproliferative Effekte haben kann [61]. Die proliferativen Effekte von TGR5 werden hierbei über einen EGFR-Src-ERK Signalweg vermittelt [66].

Neben den bereits genannten Funktionen fördert TGR5 darüber hinaus die Chlorid- und Bikarbonat- Sekretion [67], bildet den Bikarbonat-Umbrella [62], moduliert die Regeneration und die Füllung der Gallenblase [41] und wirkt antiinflammatorisch [68].

Ein Knockout von TGR5 führt zu einem gesunden und fruchtbaren Phänotyp mit normaler Entwicklung [63]. Jedoch haben TGR5 Knockout Mäuse im Gegensatz zu den Wildtypen kleinere Gallenblasen [47], einen reduzierten Gallensäure-Pool [64], neigen zu Fettlebern [67] und sind vor Gallensteinen geschützt [69].

Als Liganden binden an den TGR5 Rezeptor sowohl konjugierte, als auch unkonjugierte Gallensäuren [70] und des Weiteren verschiedene neuroaktive Steroidhormone [45]. Die Tauroolithocholsäure (TLCA) und Taurodeoxycholsäure (TDCA) stellen die potentesten endogenen Liganden dar [71].

TGR5 ist in humanen Cholangiokarzinomen gegenüber dem umgebenden Gewebe überexprimiert und gewinnt so an zusätzlicher Relevanz [33].

1.3 Rolle von Gallensalzrezeptoren beim Cholangiokarzinom

Wie oben bereits aufgeführt stellt eine Cholestase einen Risikofaktor für die Entstehung eines CCC dar. Durch welche Mechanismen eine Cholestase zur CCC Entstehung beiträgt ist allerdings weitgehend unklar. Eine Analyse verschiedener Gallensalzrezeptoren im CCC ergab eine hohe Expression von S1PR2 sowie TGR5 [31, 33, 66].

S1PR2 ist als G-Protein gekoppelter Rezeptor im humanen und murinen Cholangiokarzinom und Cholangiokarzinomzelllinien gegenüber dem umgebenden normalen Gewebe

überexprimiert [40]. S1PR2 wird durch konjugierte Gallensäuren aktiviert und nimmt eine Schlüsselrolle im Zellwachstum, der Proliferation, der Migration und Invasion von Cholangiokarzinomzellen ein [1].

Auch TGR5 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor und im humanen und murinen Cholangiokarzinom und Cholangiokarzinomzelllinien ähnlich wie S1PR2 gegenüber dem umgebendem normalen Gewebe überexprimiert [62, 67]. TGR5 fördert die Proliferation bzw. Apoptose-Resistenz [63] und die Migration und Invasion im Cholangiokarzinom [62]. Darüber hinaus korreliert die Expression von TGR5 mit dem Grad der perineuralen Invasion im Gewebe von Cholangiokarzinomen [15]. Spannend ist, dass sowohl TGR5 als auch S1PR2 Proliferation von CCC Zellen über MAP Kinasen, d.h. ERK Aktivierung, vermitteln [1, 66].

Neben den Membranrezeptoren spielen auch die nukleären Rezeptoren FXR (Farnesoid X Rezeptor) und VDR (Vitamin D Rezeptor) als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren eine mögliche Rolle bei der CCC Entstehung [45]. Beide besitzen jeweils eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale Liganden-Bindungsdomäne [40]. Damit besonders hydrophile Gallensäuren diese Transkriptionsfaktoren im Nukleus erreichen können, sind jeweils spezifische Transporter in der Plasmamembran notwendig [72].

FXR ist im Cholangiokarzinom gegenüber dem normalen umgebenden Gewebe herunterreguliert [31]. Da der Rezeptor eher antiproliferative Wirkungen vermittelt, folgt hieraus eine geringere schützende Wirkung von FXR als Tumorsuppressorgen in der Tumorgenese [42].

Der VDR ist in zahlreiche physiologische und pharmakologische Prozesse involviert [47] und dafür in den meisten Geweben exprimiert, darunter auch im Cholangiozyten [40]. Dort hat er auch Auswirkungen auf den Gallensäuremetabolismus [43]. Die Aktivierung des VDR durch Calcitriol [73], dem aktiven Metaboliten von Vitamin D [34] und potentesten endogenen Agonisten [47], reduziert dosisabhängig die Proliferation in Cholangiokarzinomzelllinien [34].

Die Expression vom VDR nimmt vom Cholangiozyten im normalen Gallengangsepithel über die Hyperplasie, die Dysplasie bis zum CCC graduell zu [34]. Im CCC korreliert die Expression mit dem histologischen Grading, da diese mit zunehmender Dedifferenzierung des Tumors abnimmt [34]. Darüber hinaus vermittelt VDR ähnlich wie FXR antiproliferative Effekte im CCC [34].

Insgesamt stellt sich die Rolle von Gallensäuren beim CCC so dar, dass Gallensäuren über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die Proliferation und Progression fördern und über nukleäre Rezeptoren antiproliferative Effekte ausüben [62].

2 Ziel dieser Arbeit

Das Cholangiokarzinom ist ein seltener, hoch maligner Tumor des intra- und extrahepatischen biliären Traktes, der mit einer meist limitierten chirurgischen Behandlung und einem tödlichen Verlauf einhergeht [1]. Einer der Risikofaktoren bzw. assoziierten Faktoren für das Cholangiokarzinom ist die Cholestase bzw. die Akkumulation von Gallensäuren [11], weshalb Gallensalzrezeptoren in der CCC Pathogenese von Bedeutung sein könnten.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der TGR5 Rezeptor für Proliferation sowie Zellschutz verantwortlich ist und zudem im humanen CCC überexprimiert wird [62, 67].

Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch der S1PR2 Rezeptor im humanen CCC überexprimiert ist [40] und eine ähnliche Funktion bezüglich Zellproliferation und Invasivität wie der TGR5 Rezeptor zeigen kann [1]. Allerdings wurde die Expression beider Rezeptoren getrennt und nie gleichzeitig in einem CCC-Kollektiv untersucht. Während die Rezeptoren bezüglich der Cholangiozytenproliferation ähnliche Funktionen haben und beide den ERK Signalweg aktivieren, unterscheidet sich die Antwort der TGR5 bzw. S1PR2-defizienten Mäuse auf eine obstruktive Cholestase. Ein Fehlen von S1PR2 milderte hier sowohl den cholestatischen Leberschaden, als auch die Fibroseentwicklung, wohingegen ein Verlust von TGR5 zu einem ausgeprägteren Leberschaden führte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Frage, ob der TGR5 Rezeptor und der S1PR2 Rezeptor komplementäre Funktionen in Cholangiozyten und CCC haben, untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten im ersten Schritt Antikörper gegen S1PR2 etabliert werden. Anschließend sollte dann die Charakterisierung der Lokalisation, Expression und Bedeutung der Gallensäure-Membranrezeptoren S1PR2 und TGR5 im CCC und CCC Zelllinien erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Humane Gallengangskarzinome und Randgewebe

Es standen zehn zusammengehörige Paare mit teils mehreren Proben aus humanen intrahepatischen Gallengangskarzinomen und Randgewebe desselben Patienten oder derselben Patientin aus der Biobank der Universität Düsseldorf zur Verfügung (Ethikvotum interne Studiennummer 5350 [66]). Dabei gilt das makroskopisch gesunde Randgewebe als Kontrolle im Sinne des normalen umgebenden Gewebes. Hiervon wurden Kryoschnitte der Schichtdicke 5 bzw. 7µm mit einem Leica Kryotom angefertigt, luft-getrocknet und anschließend bei -20°C gelagert.

3.1.2 Murine Leberkryoschnitte

Es wurden murine Leberkryoschnitte der Schichtdicke 5 bzw. 7µm mit einem Leica Kryotom angefertigt, luft-getrocknet und anschließend bei -20°C gelagert.

3.1.3 Zelllinien

H-69	Immortalisierte humane Cholangiozyten (transformiert mit dem simian virus 50) [33]
TFK-1	Extrahepatisches humanes Cholangiokarzinom, etabliert 1995 aus einem mittig im DHC gelegenen Tumor von einem 63 Jahre alten Mann, Histologie: überwiegend papilläres, teils moderat tubulär differenziertes Adenokarzinom [74]
HuCCA1	Intrahepatisches humanes Cholangiokarzinom, etabliert 1991 von einem 54 Jahre alten Mann südost-asiatischer Herkunft, Tumor ist assoziiert mit <i>Opisthorchis viverrini</i> [75]
HuCCT1	Primär Intrahepatisches humanes Cholangiokarzinom, etabliert 1989 aus dem Aszites eines 56 Jahre alten Mannes, sekretiert den Tumormarker CA 19/9, Histologie: moderat differenziertes Adenokarzinom [76]
EGI-1	Humanes Cholangiokarzinom, etabliert 1984 von einem soliden Tumor eines 52 Jahre alten Mannes, bereits metastasiert und vor Explantation nicht chemotherapiert, primäre Histologie: großzelliges Adenokarzinom geringe

	Differenzierung [https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-385 , 04.11.22]
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen (transformiert mit dem humanem Adenovirus 5) [77]
TFK C1B TGR5 KO	Aus einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe stammender TFK-1 Crispr-Klon mit einem nicht funktionalen TGR5-Protein
TFK D7H TGR5 wt	Gilt als Kontrolle zur o.g. TFK C1B TGR5 KO Zelllinie
MNC TGR5 KO	Murine Cholangiozyten von TGR5 Knockout Mäusen
MNC TGR5 wt	Murine Cholangiozyten von TGR5 Wildtyp Mäusen

3.1.4 Kulturmedien

EGI-1	500 ml DMEM 4,5g /l Glucose (Fa. Gibco # 41965-039) 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin (Fa. Gibco #15240-062) 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (MEM)	
TFK-1	RPMI 1640 (wenn ohne L-Glutamin, dann 5ml L-Glutamin zusetzen) 50ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin	
H69	375 ml DMEM 4,5g /l Glucose (Gibco # 41965-039) 125 ml Hams F12 (Gibco # 21765-029) 50 ml FCS 5 ml 100x Anti-Anti (Gibco #15240-062) 5 ml 100x Adenin (Sigma #A-2786) 500 µl 1000x Insulin (Gibco #12585-014) 50 µl Transferrin Stock: 50mg/ml in H ₂ O (Sigma #T-1283) 50 µl Triiodothyronin Stock: 20mM in 1N NaOH (Sigma #T-16397) 40 µl Hydrocortison Stock: 5mg/ml in Ethanol (Sigma #H-0888) 50µl Cholera toxin Stock 100µg/ml (Sigma #C-8052)	Endkonz. 10% 1% 0,18mM 4µg/ml 5µg/ml 2nM 1,1µM 10ng/ml

HuCCA1	Hamis-F12 (F-12 Nut Mix (Ham)) 50ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin
HuCCT1	RPMI 1640 (wenn ohne L-Glutamin, dann 5ml L-Glutamin zusetzen) 50ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin

3.1.5 Wirkstoffe Taurocholsäure und JTE013

Generell ist Taurocholsäure (TCA) ein amphiphiles Molekül [40], welches mit Cholesterin und Phospholipiden ab einer kritischen Konzentration Mizellen bildet und in der Gallenblase gespeichert wird [59]. Die physiologischen Funktionen von Gallensäuren umfassen die Emulsion von Fettsäuren und fettlöslichen Vitaminen und deren Absorption, Regulation von Cholesterol-, Glukose- und Fettsäuremetabolismus und die Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere bzw. Homöostase des Mikrobioms [60].

Die individuelle Zusammensetzung bzw. Synthese eines Gallensäure-Pools und auch des Konjugations-Status mit Taurin bzw. Glycin variiert mit der Spezies, der Ernährung, dem Alter, dem Geschlecht, hormonell, in pathologischen Zuständen, genetisch und wird von Medikamenten beeinflusst [78].

Für diese Arbeit ist die Funktion der Gallensäuren als Signalmolekül wichtig [57].

Unter den Gallensäuren ist die konjugierte Taurocholsäure (TCA) sehr hydrophil, weshalb sie an die Plasmamembran gebundenen S1PR2- und TGR5 Rezeptoren [64, 79] bindet, ohne die Zellmembran zu passieren [1].

JTE013 wurde auf Grund seiner geringen Löslichkeit [46] in DMSO gelöst und als chemischer S1PR2 -Antagonist [50] verwendet.

3.1.6 Antikörper anti-S1PR2-1 und S1PR2-2

In unserem Auftrag wurden von der Peptide Specialty Laboratories GmbH in Heidelberg zwei für den S1PR2 Rezeptor spezifische polyklonale Antiseren in Meerschweinchen hergestellt: Zum einen der extrazellulär, am N-Terminus bindende anti-S1PR2-1 Antikörper und zum anderen der intrazellulär am C-Terminus bindende anti-S1PR2-2 Antikörper. Bei der Rezeptorgröße von 353 Aminosäuren vom S1PR2 Rezeptor bindet dabei der anti-S1PR2-1 Antikörper an den Aminosäuren 16-25 und der anti-S1PR2-2 Antikörper an den Aminosäuren 329-345.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

3.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Jede Zelllinie wurde in einem Inkubator unter 5% CO₂, in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre unter 37°C kultiviert. Die zur Arbeit unter der Sterilbank notwendigen Kunststoffmaterialien (wie bspw. Zellkulturschalen) stammten von den Firmen TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz und Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande.

3.2.1.2. Transfektion von HEK293 Zellen

Um die anti-S1PR2 Antikörper zu charakterisieren, erfolgte eine Transfektion von HEK293 Zellen. Dabei kondensiert das kationische Polymer Polyethylenimine (PEI, Aldrich, Darmstadt, Deutschland) die S1PR2 cDNA in einem Plasmid als positiv geladenes Partikel, welches an die anionische Zelloberfläche bindet und so endozytiert wird und letztlich in das Zytoplasma gelangt [80]. Die DNA verbleibt extrachromosomal und wird nicht in das Genom integriert, weshalb die Transfektion als transient beschrieben wird.

Die Zelllinie HEK293 wird verwendet, da diese gegenüber anderen eine hohe Transfektionseffizienz und ein hohes Level an Proteinexpression aufweist [80].

Hierzu wurden 100 µL serum-freies OptiMEM steril mit 500ng S1PR2-cDNA versetzt, vermischt und anschließend 1 µg in 1 µL PEI hinzugegeben. Nachdem das Transfektionsgemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde es tropfenweise auf die am Vortag vorbereiteten HEK293 Zellen gegeben, wobei sich pro Well 0,5x10⁶ Zellen befanden. Danach wurden die transfizierten Zellen sanft geschwenkt und nach 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, sodass die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung bereit waren.

3.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden Zellen in einer 80% Dichte auf im Durchmesser 16mm große Glasdeckplättchen (VWR International GmbH, Darmstadt, D) ausgesät und anschließend je nach Färbung stimuliert/inhibiert bzw. mit Hungermedium behandelt. Zudem wurden am Kryotom Gefrierschnitte (Schichtdicke 5-8 µm) von humanen Cholangiokarzinomen bzw. humanen und murinem Lebergewebe hergestellt. Diese Gefrierschnitte wurden jeweils bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Zu Beginn der Färbung wurden die Zellen bzw. die Gefrierschnitte entweder für 20 min mit 4% Paraformaldehyd, oder für 3 min mit -20°C kaltem Methanol fixiert. Anschließend mussten die mit Paraformaldehyd behandelten Präparate zunächst für 2 min in 0,1% Triton-X-100 auf Eis permeabilisiert werden. Nach mehrfachen 10-minütigen Waschschritten in PBS begann dann der 30-minütige Blockierungsvorgang unspezifischer Bindungen mit 5% FCS bei den auf Glasdeckplättchen ausgesäten Zellen und mit 2% FCS + 3% Schaaf-Serum bei den Gewebe-Gefrierschnitten. Es folgte die Beschichtung der Zellen bzw. des Gewebes bei Raumtemperatur mit den Primärantikörpern in einer bestimmten Verdünnung in der jeweiligen Blockierungslösung. Dieser Schritt nahm 60 min in Anspruch. Daraufhin erfolgte nach erneuten 10-minütigen Waschschritten mit PBS, die Beschichtung der Zellen bzw. des Gewebes mit den Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern im Dunkeln für 60 min. Nach erneuten Waschschritten wurden die Zellen bzw. das Gewebe mit Hilfe des Mounting Mediums (DAKO, Hercules, USA) eingedeckelt und anschließend mit Nagellack fixiert. Die Betrachtung der Färbungen erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena, D). Die dazugehörige verwendete Software ist der Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121.

Tabelle 1 : Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Herkunft	Firma	Verwendung
Primärantikörper			
Troma-III Cytokeratin19	Ratte monoklonal	Hybridoma Bank, Iowa; USA	1:100
S1PR2-1/2	Meerschwein polyklonal		1:50
PDI	Maus monoklonal	Thermo Scientific Rockford, IL USA	1:100
Anti-Na/K ATPase	Maus	Millipore Temecula, CA USA	1:100
RVLR2 TGR5	Meerschwein polyklonal	Keitel et al., 2009	1:500
Sekundärantikörper			
Fluoreszenz- gekoppelte Antikörper	abhängig v. Primärantikörper: Meerschwein, Maus	Jackson Immuno Research Laboratories West Grove; USA	FITC (1:100) Cy3 (1:500)

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten für die Proteinanalytik

Die auf den 6-Well-Zellkultur-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) bei 37°C im Brutschrank kultivierten Zellen wurden nach Versuchsende mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte mit Hilfe des RL-Puffers (50 µl pro 6-Well) und eines Zellschabers die Ernte der Zellen. Daraufhin wurden die Proben weggefroren bzw. mindestens 10 min auf Eis gehalten, bevor mit diesen zweifach ein 10-Sekunden dauernder Ultraschall durchgeführt wurde. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 2.500 rpm und 4°C. Anschließend wurden die Proteine im Zelllysate im Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, dabei wurden diese von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt, die danach verworfen wurden.

3.2.3.2 Proteinbestimmung mittels Bradford Reagenz

Die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford wurde anhand der Herstellerangaben mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays (Bio-Rad, München) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brilliantblau von $\lambda = 465$ nm zu $\lambda = 595$ nm im sauren Milieu unter Proteinbindung jeweils abhängig von deren Menge. Die Messung der Extinktion erfolgte dementsprechend bei $\lambda = 595$ nm in einer Dreifachbestimmung mit einem Multiscan Photometer der Firma Thermo Scientific.

3.2.3.3 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinmenge pro Tasche betrug 30-50 µg. Dabei wurden die unterschiedlichen Volumina mittels zusätzlichen RL-Puffers ausgeglichen. Anschließend erfolgte ein Zusatz im Verhältnis von 1:4 eines Gemisches aus 450 µL Lämmli (5x)-Auftragspuffer und 50 µL β -Mercaptoethanol. Dieses Probengemisch wurde danach für 3 min bei 95°C unter Rütteln denaturiert, um zu erreichen, dass das SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt und die Proteine somit nur noch nach ihrer Größe und nicht mehr nach ihrer Eigenladung aufgetrennt werden. Nach einer kurzen Zentrifugation konnten die Proben verwendet werden. Die Sammelgele hatten immer die gleiche PAA-Konzentration von 5%. Die PAA-Konzentration der SDS-Polyacrylamid-Trenngele variierte je nach Größe des zu detektierenden Proteins zwischen 10 und 12%. Die Elektrophorese erfolgte in einem System der Firma Biometra (Göttingen) mit einer Spannung zwischen 100 und 160V über drei bis fünf Stunden. Als

Proteinstandard wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad, München) eingesetzt. Für vereinzelte Experimente wurde zudem der Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet.

3.2.3.4 Western Blot

Nach Abschluss der Elektrophorese fand der eigentliche Blot nach dem Semidry-Blotting-Prinzip in einer Elektrobloiting-Apparatur der Firma Biometra (Göttingen) statt. Dazu wurde die Blotting Kammer von der Anode zur Kathode wie folgt aufgebaut: 6-fach Whatman-Papier (Schleicher & Schuell) getränkt in Anodenpuffer I, 3-fach Whatman-Papier getränkt in Anodenpuffer II, darauf die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (GE Healthcare Braunschweig) und das jeweilige Gel, zuletzt 6-fach Whatman-Papier getränkt in Kathodenpuffer. Dabei benötigte der Proteintransfer von Gel zu Membran 75min bei 117mA. (1 mA/cm^2) Anschließend erfolgte der Blockierungsvorgang freier Bindungsstellen mit je nach verwendetem Antikörper 5% BSA in TBS-T (Roche, Mannheim) oder 3% Milchpulver in TBS-T (Roth, Karlsruhe) für jeweils 30 min. Daraufhin wurde unter Rütteln über Nacht bei 4°C der jeweilige Erstantikörper in der Blockierungslösung in einer bestimmten Verdünnung dazugegeben. Am nächsten Tag erfolgt nach drei Waschschritten mit TBS-T über jeweils 15min die Zugabe des für den Erstantikörper spezifischen Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers. Nach erneuten dreimaligen 15-minütigen Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Detektion mit Hilfe des Western Lightning plus ECL- Kit (PerkinElmer, Hopkinton, Massachusetts, USA) digital im ChemiDoc MP Imaging System (Biorad, München).

3.2.3.5 Lösen der Antikörperkomplexe von PVDF-Membranen

Um die Proteine auf der PVDF-Membran nach der Detektion einer erneuten Zugabe eines anderen Primärantikörpers zugänglich zu machen, musste die Membran 15 min bei Raumtemperatur mit dem Stripping Puffer behandelt und anschließend dreimalig 5-minütigen Waschschritten mit TBS-T unterzogen werden. Vor der Zugabe des neuen Primärantikörpers, musste wiederum ein erneuter Blockierungsvorgang wie oben beschrieben erfolgen.

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 Tabl./l Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete, Roche, Mannheim)
Lämmli (5x)-Auftragspuffer	31,25 ml 1 M Tris pH 6,8 20 ml Glycerin 10 g SDS Bromphenolblau (Bio-Rad, München)
RS/DTT-Auftragspuffer	800 μ l RS-Puffer 400 μ l 180 mM DTT (Sigma; München) 10 μ l Bromphenolblau (Bio-Rad, München)
RS-Puffer	147 μ l 1,5 M Tris pH 8,0 450 μ l 0,5 M EDTA 4,5 ml 20 % SDS 6,16 g Sucrose 50°C erhitzen
Elektrophoresepuffer (10x)	60 g Tris 300,28 g Glycin 20 g SDS ad 2 l Aqua dest.

Anodenpuffer I	300 mM Tris
	20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris
	20 % Methanol
Kathodenpuffer	40 mM Aminocaprinsäure
	20 % Methanol
Stripping-Puffer	1 M Tris/HCl
	10 % SDS
	vor Gebrauch 7 % β -Mercaptoethanol
TBS-T (10x) pH 7.6	20 mM Tris/HCl
	137 mM NaCl
	0,1% Tween

Tabelle 2 : Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Proteinanalytik

Antikörper	Herkunft	Firma	Verwendung
Primärantikörper			
GAPDH	Maus monoklonal	Millipore Billerica, USA	1:5000
ERK 1/2 Phospho (p44/42 MAPK)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Danvers; USA	1:1000
ERK 1/2 Total (p44/42 MAPK)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Danvers; USA	1:1000
S1PR2 1/2	Meerschwein polyklonal		1:1000
Sekundärantikörper			
HRP-anti-Kaninchen	Ziege polyklonal	DAKO Hercules; USA	1:5000
HRP-anti-Maus	Kaninchen, polyklonal	DAKO Hercules; USA	1:5000
HRP-anti-Meerschwein	Ziege, polyklonal	DAKO Hercules; USA	1:5000

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA-Isolation, Reverse Transkription und quantitative Real-Time-PCR

Die adhärenenten Zellen wurden von der jeweiligen Oberfläche mittels Trypsin (Biowest, Nuaille, Frankreich) gelöst und die Gesamt-RNA automatisiert nach Herstellerangaben mit dem Maxwell-Kit der Firma Promega (Madison, USA) aufgereinigt und bei -20°C gelagert. In der Folge wurde die Konzentration und Reinheit der RNA spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm / 280 nm bestimmt mit Hilfe eines Nanodrops (Pepqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Die Reverse Transkription von 1µg der jeweiligen RNA-Probe wurde mittels Biozym cDNA Synthese Kit (Hessisch Oldendorf, D) nach Herstellerangaben 30 min lang bei 55°C und anschließend 5 min lang bei 99°C unter Schütteln durchgeführt.

Die quantitative Real-Time-PCR der cDNA erfolgte mittels der SYBR® Green-Methode in einer 96-Well-Reaktionsplatte jeweils in Doppelbestimmung in dem LightCycler 480 von Roche (Basel, Schweiz). Die Ergebnisse wurden anhand von Schmelzkurvenanalysen und der Δ CT-Methode bestimmt.

Der SYBR® Green Master Mix, die humanen sowie murinen Primer für S1PR2 und GPBAR1 (=TGR5) sowie von den Housekeeping Genen HPRT und SDHA stammten von BIO RAD Laboratories (USA).

3.2.4.2 Mykoplasmentest

Um eine Kontamination der Zellkulturlinien mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden die Zellkulturen mittels Venor GeM Classix Mycoplasma Detection Kit überprüft.

Dabei amplifiziert die DNA-Polymerase mit Hilfe der Primer einen Abschnitt der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms, welches anschließend im Agarosegel mit einer Größe von ca. 267 Basenpaaren detektiert werden kann. Eine Vervielfältigung eukaryotischer DNA erfolgt nicht.

Im Einzelnen wurden 500 µL Zellkulturüberstand einer Zellkultur mit 90-100% Konfluenz als Probe eingesetzt, welcher zuvor 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend 5 Sekunden (s) bei 13.000 rpm zentrifugiert werden musste. Letztlich wurden nur 2 µl des Überstandes eingesetzt. In diesem Schritt wurden die Mykoplasmen lysiert und DNasen inaktiviert.

Wie das Probematerial wurden eine Negativ-, sowie eine Positivkontrolle mit jeweils 2 µl zu 23 µl eines Reaktionsgemisches gegeben. Das Reaktionsgemisch beinhaltete u.a. die Primer, Nukleotide und die Polymerase. Anschließend erfolgte die PCR im Thermocycler. Im ersten Zyklus bei 94°C für 2 min, dann für insgesamt 39 Zyklen bei 94°C für 30 s, bei 55°C für 30 s und bei 72°C für 30 s-, um danach auf 4-8°C abgekühlt zu werden.

Die Elektrophorese erfolgte in einem 1,5% Agarosegel mit jeweils 5µl des PCR-Reaktionsansatzes gemischt mit einem Bromphenolblau-Ladepuffer über 20 min bei 100 V.

Eine Mykoplasmen spp. konnte bei ca. 267 Basenpaaren detektiert werden und die interne Kontrolle bei 191 Basenpaaren. Jedoch war die interne Kontrolle bei einer positiven Probe irrelevant, da die Mykoplasmen -DNA und die DNA der internen Kontrolle in der PCR miteinander konkurrierten und die Bande der internen Kontrolle bei $> 10^2$ Kopien pro Reaktion kaum sichtbar war.

3.2.4.3 Statistische Auswertung

Die Daten sind jeweils angegeben als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. Für die statistische Auswertung der Real-Time-PCR wurde die Signifikanz berechnet. Hierzu wurde ein zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt und p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen und mit „*“ gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der neuen anti-S1PR2 Antikörper

4.1.1 in HEK293 Zellen

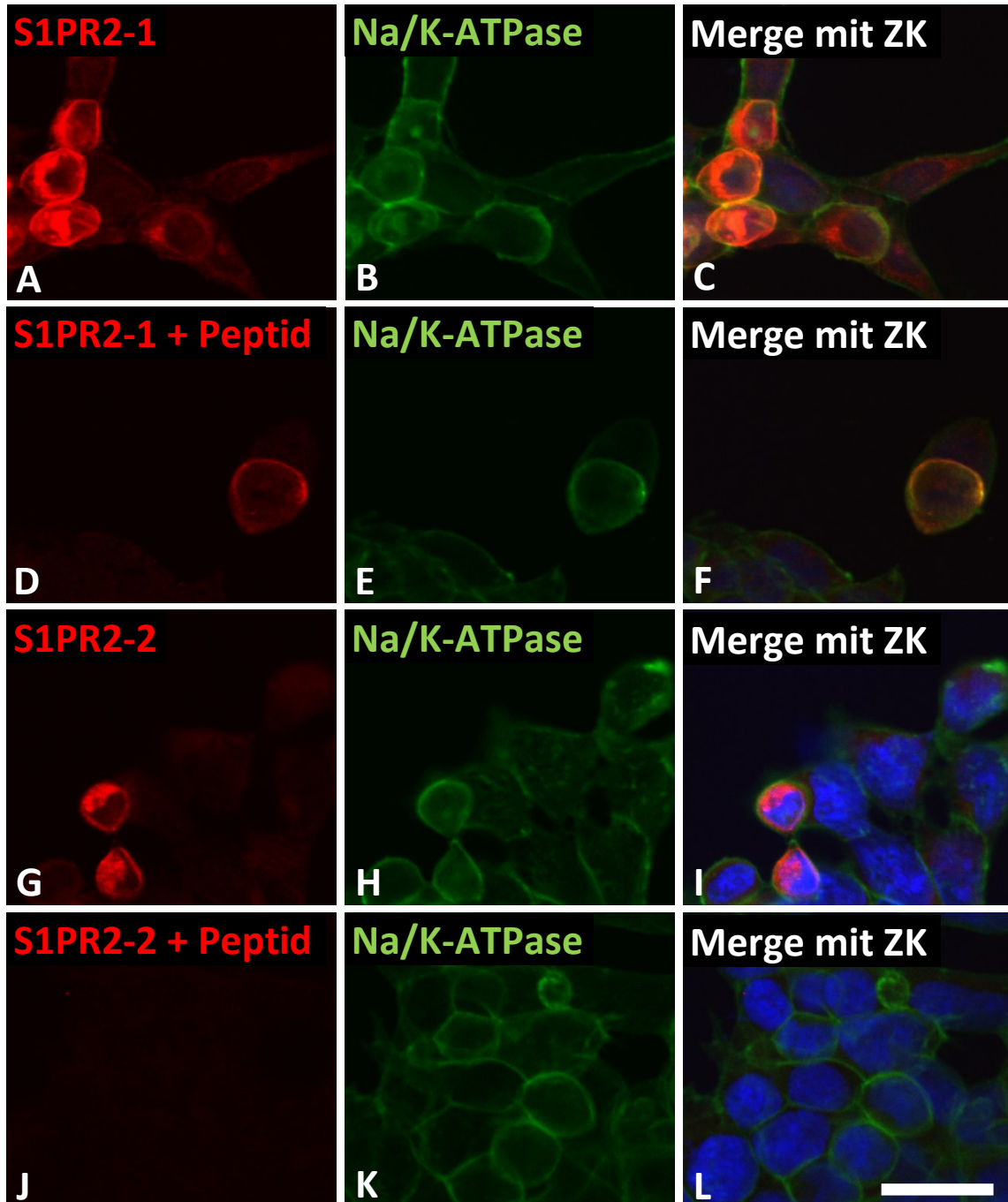


Abbildung 1: Charakterisierung der neuen anti-S1PR2 Antikörper in HEK293 Zellen. Die polyklonalen anti-S1PR2 Seren wurden mit Hilfe eines Cy3-gelabelten Zweitantikörpers sichtbar gemacht und sind in rot dargestellt. Ein Antikörper gegen Natrium-Kalium (Na/K) ATPase wurde mit einem FITC-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Na/K ATPase diente hier als Markerprotein für die Zellmembran. Die Zellkerne (ZK) wurden mit Hoechst angefärbt. (Balken = 50µm)

Um die neuen anti-S1PR2 Antikörper zu charakterisieren, wurden HEK293 Zellen mit S1PR2-cDNA transient transfiziert. Dabei wurde S1PR2 mit beiden polyklonalen Antisera in der Plasmamembran der HEK Zellen detektiert, wo sich eine Kolokalisation mit dem Signal für die Na/K ATPase zeigte. Allerdings fand sich insbesondere bei stark S1PR2 exprimierenden Zellen auch ein intrazelluläres vesikuläres Muster, das ebenfalls durch die Antisera erkannt wurde (Abb. 1A und G). Als Kontrolle wurde ein jeweils Antikörper-spezifisches Peptid verwendet, welches das S1PR2 Signal blockierte. In J wird das S1PR2-Fluoreszenzsignal durch das zur anti-S1PR2-2 Antikörper Generierung verwendete, spezifische Peptid vollständig geblockt. In D bleibt im Gegensatz dazu ein S1PR2-Fluoreszenzsignal bestehen, obwohl auch das verwendete Peptid für den anti-S1PR2-1 Antikörper spezifisch ist. Eine Färbung von nicht-transfizierten Zellen fand sich nicht. In Zusammenschau mit dem Blockierungsexperiment lässt sich daraus eine spezifische Bindung der S1PR2-1 Antikörper, als auch der S1PR2-2 Antikörper an die jeweiligen Epitope in HEK293 Zellen ableiten.

4.1.2 in Cholangiokarzinomzellen

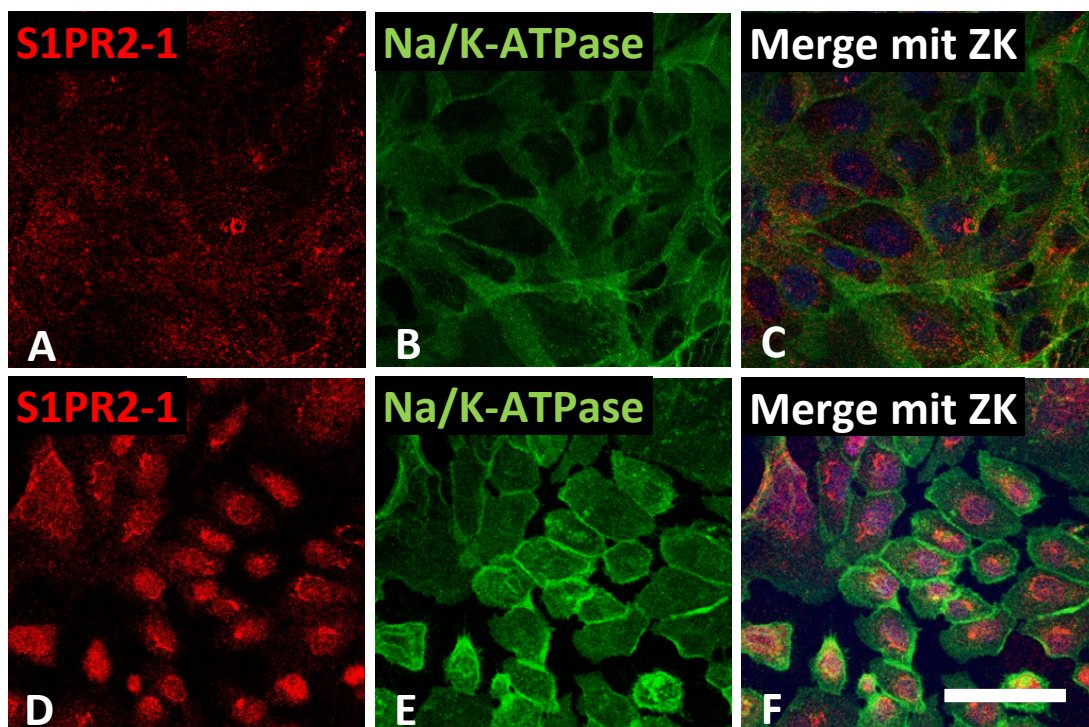


Abbildung 2: Charakterisierung des anti-S1PR2-1 AK in Cholangiokarzinomzellen.

A-C: EGI Zellen wurden mit Antikörpern gegen S1PR2 (S1PR2-1, in rot) und einem Antikörper gegen Na/K ATPase als Marker für die Zellmembran angefärbt. D-F: HuCCT1 Zellen wurden mit Antikörpern gegen S1PR2-1 (in rot) sowie Na/K ATPase (in grün) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (in blau) sichtbar gemacht. (Balken = 50µm)

Im nächsten Schritt wurden die beiden anti-S1PR2 Antisera auf verschiedenen Cholangiokarzinomzelllinien eingesetzt (Abb. 2).

EGI Zellen stammen von einem gering differenzierten intrahepatischen Adenokarzinom [<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-385>, 04.11.22]. Eine Färbung dieser Zelllinie mit dem anti-S1PR2-1 Antiserum ergab ein weniger starkes und vornehmlich intrazelluläres Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den transfizierten HEK293 Zellen (Abb. 2 A-C). In HuCCT1 Zellen, die aus einem ursprünglich moderat differenzierten intrahepatischen CCC stammen [76], war das Signal für anti-S1PR2-1 stärker, jedoch auch überwiegend intrazellulär (Abb. 2 D-F). Zusammengefasst unterscheiden sich die anti-S1PR2-1 Signale in den hier verwendeten Zelllinien, was auch bedeutet, dass S1PR2 in unterschiedlichen Zelllinien in verschiedenen Zellkompartimenten detektiert werden kann, da das Signal nicht nur die mittels Na/K-ATPase markierte Plasmamembran einschließt. Mit dem anti-S1PR2-2 Serum ergab sich in beiden Zelllinien ein ähnliches Muster.

4.1.3 in Cholangiokarzinomzellen in Abhängigkeit von Stimulation mit Gallensäuren sowie Hemmung der Rezeptoraktivierung

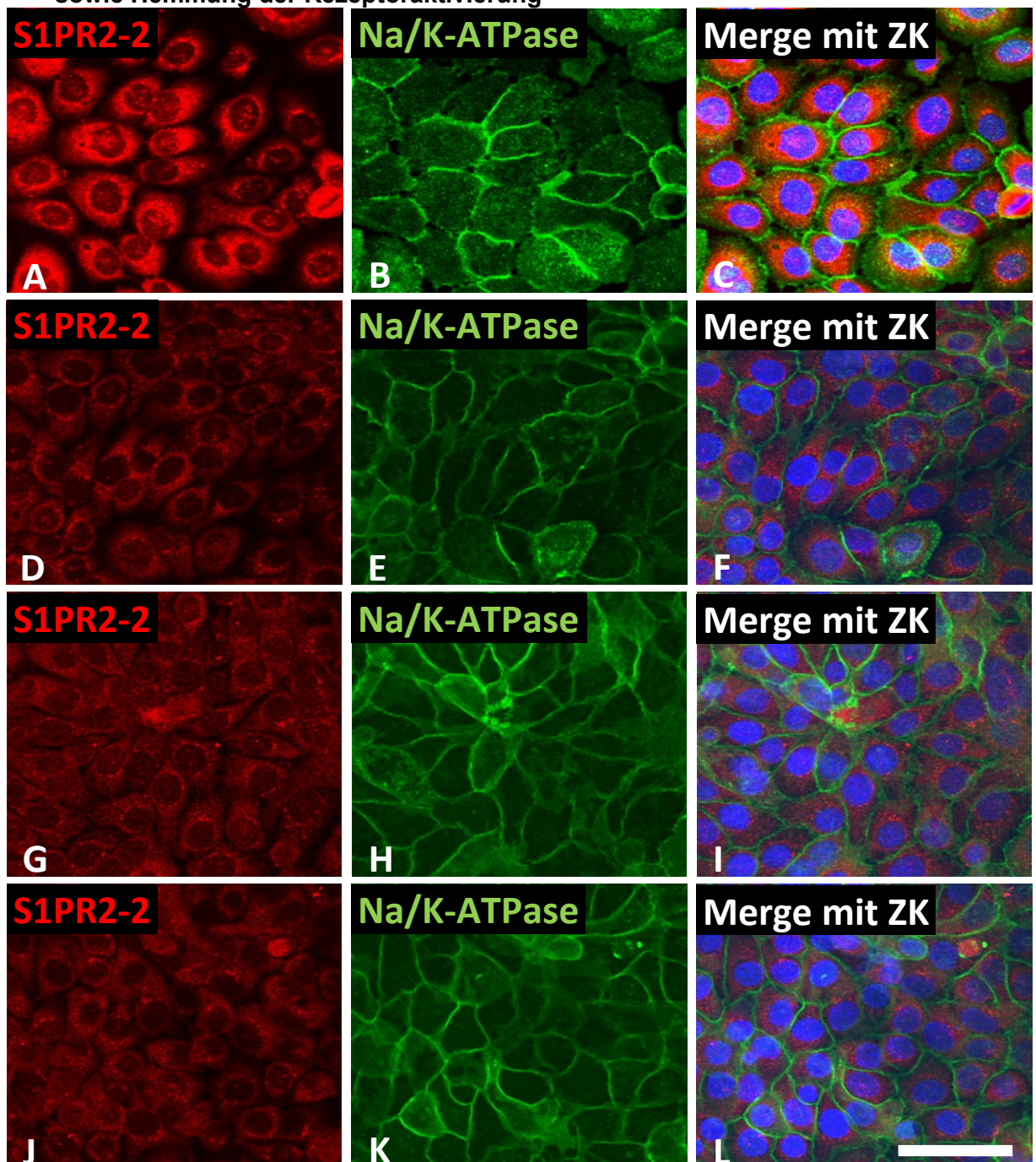


Abbildung 3: Charakterisierung des S1PR2-2 AK in Cholangiokarzinomzellen nach Rezeptorstimulation bzw. -hemmung.

A-C: HuCCA1 Zellen unter Kontrollbedingungen wurden mit Antikörpern gegen S1PR2 (S1PR2-2 in rot) und einem Antikörper gegen Na/K ATPase als Marker für die Zellmembran angefärbt. **D-F:** Mit TCA stimulierte HuCCA1 Zellen wurden mit Antikörpern gegen S1PR2 (S1PR2-2 in rot) sowie Na/K ATPase (in grün) angefärbt. **G-I:** HuCCA1 Zellen unter Inhibition mit JTE013 wurden mit Antikörpern gegen S1PR2 (in rot) sowie Na/K ATPase (in grün) angefärbt. **J-L:** HuCCA1 Zellen unter sowohl Stimulation mit TCA, als auch Inhibition mit JTE013 wurden mit Antikörpern gegen S1PR2 (in rot) sowie Na/K ATPase (in grün) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (in blau) sichtbar gemacht. (Balken = 50µm)

Es wäre denkbar, dass sich die subzelluläre Lokalisation sowie die Expression von S1PR2 in Abhängigkeit der Aktivierung des Rezeptors verändert. Daher wurde die Immunfluoreszenzfärbung nach Stimulation mit Taurocholsäure (TCA, 100 µM, 24 Stunden), mit dem S1PR2 Antagonist JTE013 (10 µM, 24 Stunden) bzw. TCA und JTE013 untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbungen in Abb.3 A-C erfolgten unter Kontrollbedingungen mit DMSO (dem Lösungsmittel von JTE013), D-F unter Stimulation mit Taurocholsäure (TCA), G-I unter Inhibition mit JTE013 und zuletzt J-L unter Stimulation und Inhibition mit TCA und JTE013. Sowohl unter Stimulation als auch unter Inhibition kann eine Veränderung des S1PR2 Signals im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

4.2 Untersuchungen zur mRNA Expression von S1PR2 und TGR5 in verschiedenen Zelllinien

4.2.1 in Cholangiokarzinomzelllinien

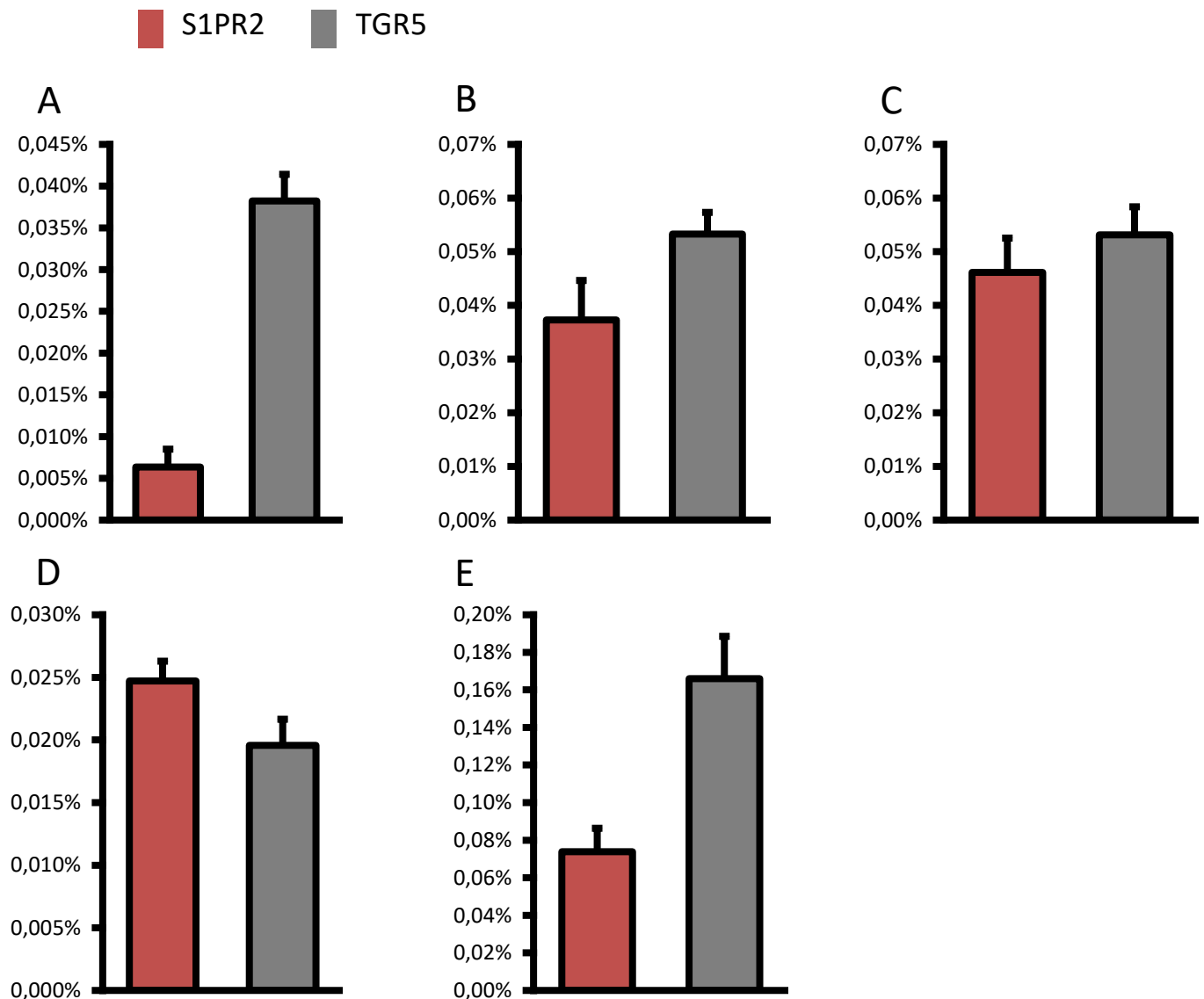


Abbildung 4: Untersuchung zur mRNA Expression von S1PR2 und TGR5 in verschiedenen Cholangiokarzinomzelllinien. Die mRNA Menge von S1PR2 und TGR5 wurde in % der Expression des Housekeeping Gens SDHA ausgedrückt.

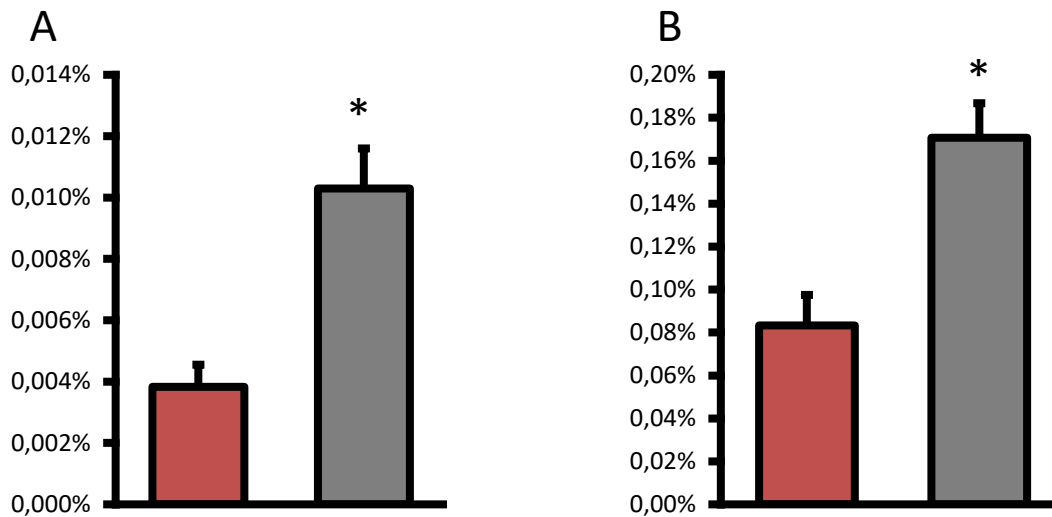
A TFK, B EGI, C H69, D HuCCA1, E HuCCT1

Um die mRNA Expression von S1PR2 und TGR5 in verschiedenen Cholangiokarzinomzelllinien zu analysieren, wurde diese bezogen auf das Housekeeping-Gen SDHA mittels Real-Time-PCR bestimmt. Dabei fällt auf, dass ausschließlich die Zelllinie HuCCA1 mehr S1PR2 mRNA exprimiert als TGR5 mRNA. Darüber hinaus ist das Verhältnis von TGR5 zu S1PR2 mRNA Expression in der Zelllinie TFK, die von einem extrahepatischen CCC stammt [74], hervorzuheben, da es mit dem Faktor 8 am größten ist. Insgesamt lässt

sich in allen verwendeten Cholangiokarzinomzelllinien eine S1PR2 mRNA und TGR5 mRNA Expression in unterschiedlichen Verhältnissen nachweisen.

4.2.2 Untersuchung zur S1PR2 mRNA Expression und S1PR2 Proteinmenge in TGR5-defizienten Zellen

■ TGR5 wt ■ TGR5 KO
TFK D7H TGR5 wt vs. TFK C1B TGR5 KO (*p<0.01)



MNC TGR5 wt vs. MNC TGR5 KO (*p<0.05)

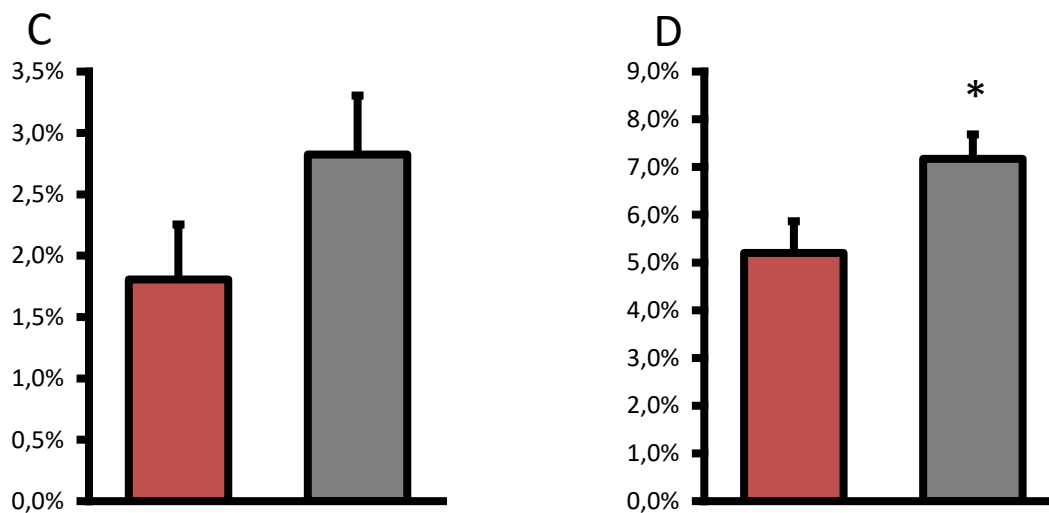


Abbildung 5: Untersuchung zur S1PR2 mRNA Expression in TGR5-defizienten Zellen in Relation zu SDHA (A, C) und HPRT (B, D). In A/B wurde eine TGR5-defiziente TFK-Zelllinie (grau) sowie die TGR5-profiziente wt Zelllinie (rot) und in C/D primäre Cholangiozyten aus TGR5 wt und TGR5 Knockout Mäusen analysiert. Die Statistik erfolgte mittels zweiseitigem ungepaarten Student's t-Test. *= signifikanter Unterschied zum Wildtyp zum genannten Signifikanzniveau.

Um die Auswirkungen einer TGR5-Defizienz auf die S1PR2 mRNA Expression zu analysieren, wurde erstens die S1PR2 Expression in der TGR5-defizienten TFK Zelllinie (TFK C1B TGR5 KO) und zweitens in TGR5-defizienten murinen Cholangiozyten (MNC TGR5 KO, Abb. 5 C und D) jeweils gegenüber dem zugehörigem Wildtyp bestimmt.

In der TGR5-defizienten TFK Zelllinie besteht eine bezogen auf zwei Housekeeping-Gene (SDHA und HPRT) signifikante Steigerung ($p < 0.01$) der S1PR2 mRNA Expression gegenüber dem Wildtyp (Abb. 5 A und B).

In TGR5-defizienten murinen Cholangiozyten besteht bezogen auf das Housekeeping-Gen HPRT eine signifikante ($p < 0.05$) Steigerung der S1PR2 mRNA Expression gegenüber dem Wildtyp (Abb. 5 D). Bezogen auf das Housekeeping-Gen SDHA bestätigt sich das Verhalten in ähnlicher jedoch zu der verwendeten Fallzahl in nicht signifikanter Weise (Abb. 5 C).

Zusammenfassend fand sich im Falle einer TGR5-Defizienz eine Steigerung der S1PR2 mRNA Expression.

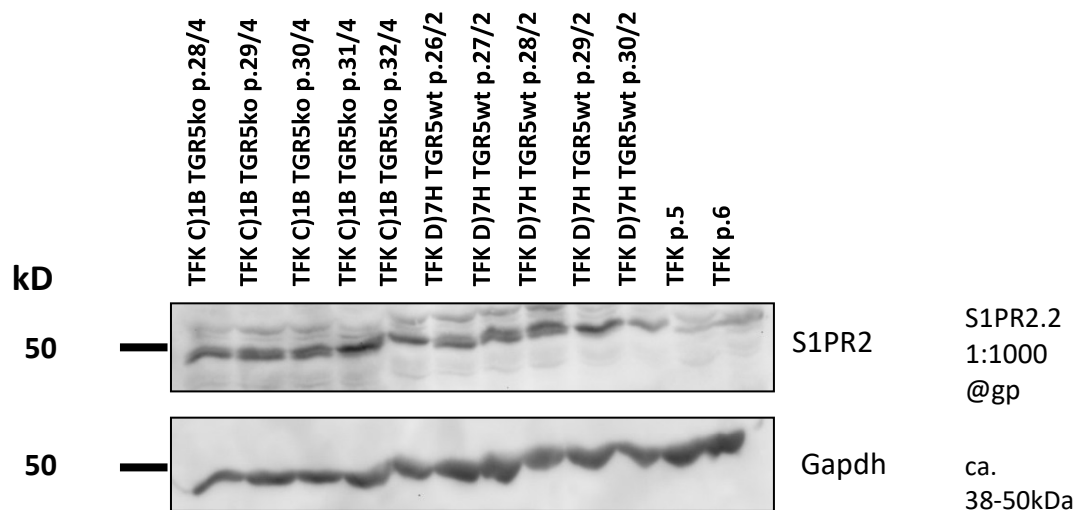


Abbildung 6: Western Blot 1: S1PR2 Proteinmenge in TGR5-defizienten TFK-Zellen

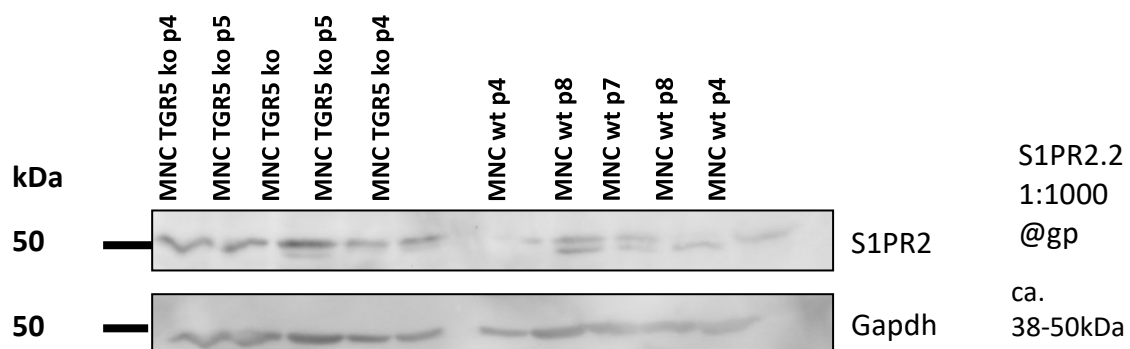


Abbildung 7: Western Blot 2: S1PR2 Proteinmenge in TGR5-defizienten murinen Cholangiozyten (MNC).

Auch die Proteinmenge an S1PR2 ist sowohl bei der TGR5-defizienten TFK Zelllinie (Abb.6) gegenüber dem Wildtyp (wt), als auch bei TGR5-defizienten (TGR5 ko) murinen Cholangiozyten (MNC) (Abb.7) gegenüber dem Wildtyp gesteigert.

4.3 Detektion von S1PR2 auf Proteinebene

4.3.1 S1PR2 Proteinmenge mittels Western Blot

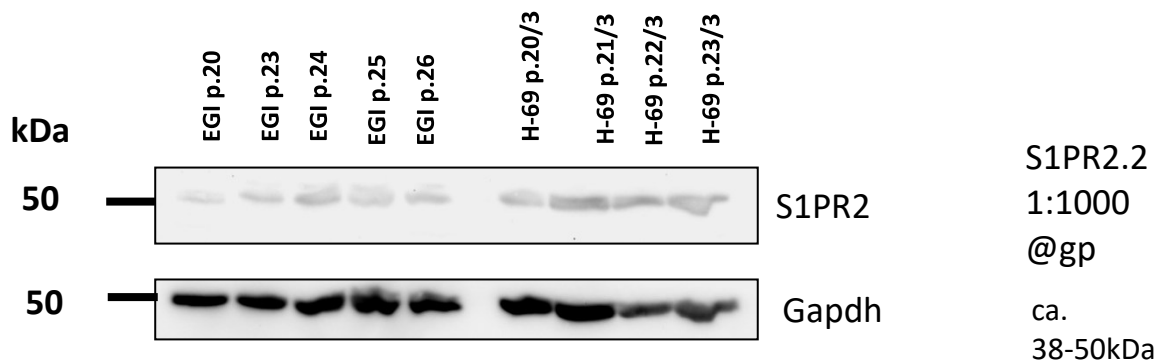


Abbildung 8: Western Blot 4: S1PR2 Proteinmenge in Cholangiokarzinomzelllinien.

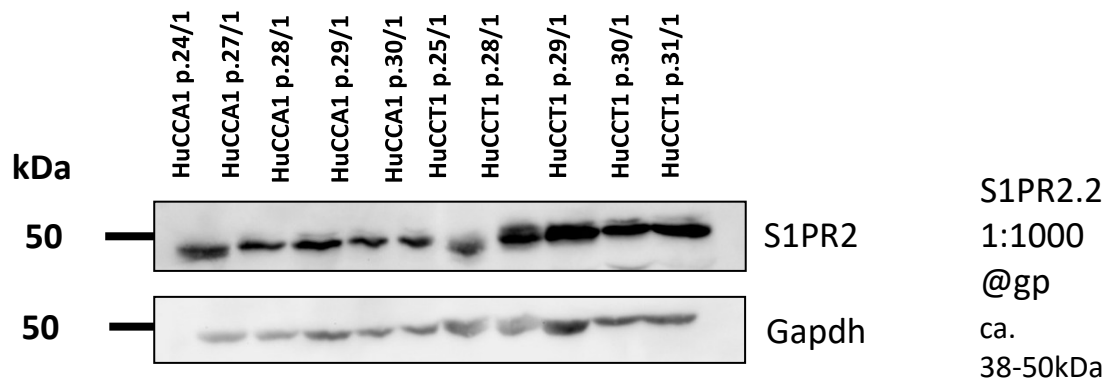


Abbildung 9: Western Blot 5: S1PR2 Proteinmenge in den CCC Zelllinien HuCCA1 und HuCCT1.

Um zu untersuchen, ob die verwendeten Cholangiokarzinomzelllinien S1PR2 auf Proteinebene exprimieren und ob die anti-S1PR2-Antikörper die Epitope erkennen, wurden Western Blots angefertigt. Hier fand sich mit dem anti-S1PR2-2 Antiserum eine Bande bei 38-50 kDa, was dem erwarteten Molekulargewicht von S1PR2 entspricht. Ein Antikörper gegen Gapdh wurde als Kontrolle verwendet. Es kann festgehalten werden, dass alle verwendeten Cholangiokarzinomzelllinien S1PR2 exprimieren, wobei die jeweilige

Proteinmenge variiert. Zudem scheint der anti-S1PR2-2 Antikörper sein Epitop in diesen Zelllinien zu erkennen.

4.3.2 Subzelluläre Lokalisation von S1PR2 mittels Immunfluoreszenzfärbung

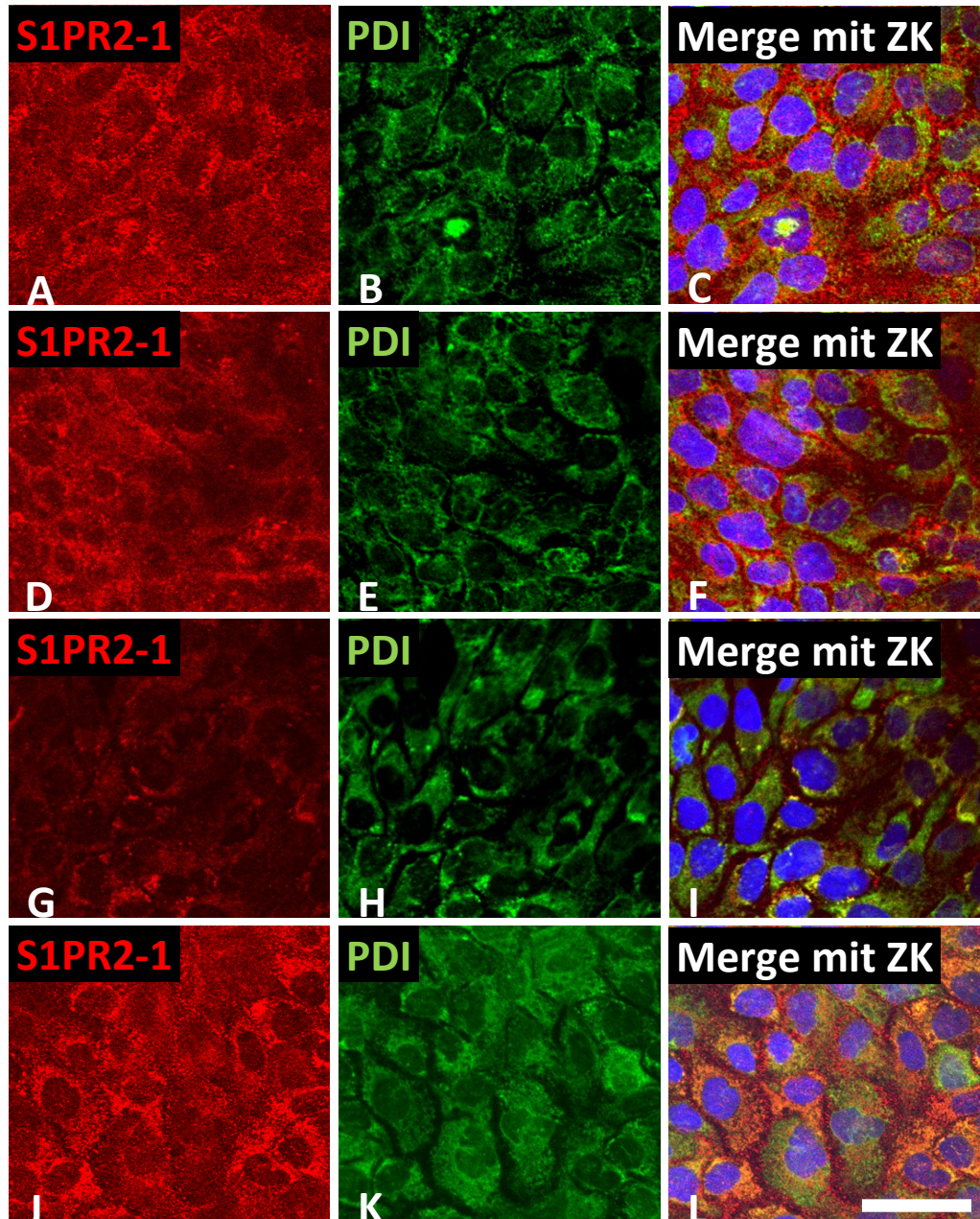


Abbildung 10: Lokalisation von S1PR2 mittels Immunfluoreszenzfärbung in HuCCT1 Zellen. Ein Antikörper gegen PDI (in grün) wurde als Marker für das endoplasmatische Retikulum verwendet. Die Zellkerne (ZK) wurden mit Hoechst in blau dargestellt. A-C: Kontrollbedingungen. D-F: Stimulation mit TCA 100µM über 24 Stunden. G-I: Stimulation mit JTE013 10µM über 24 Stunden. J-L Stimulation mit TCA und JTE013. Balken = 50µm.

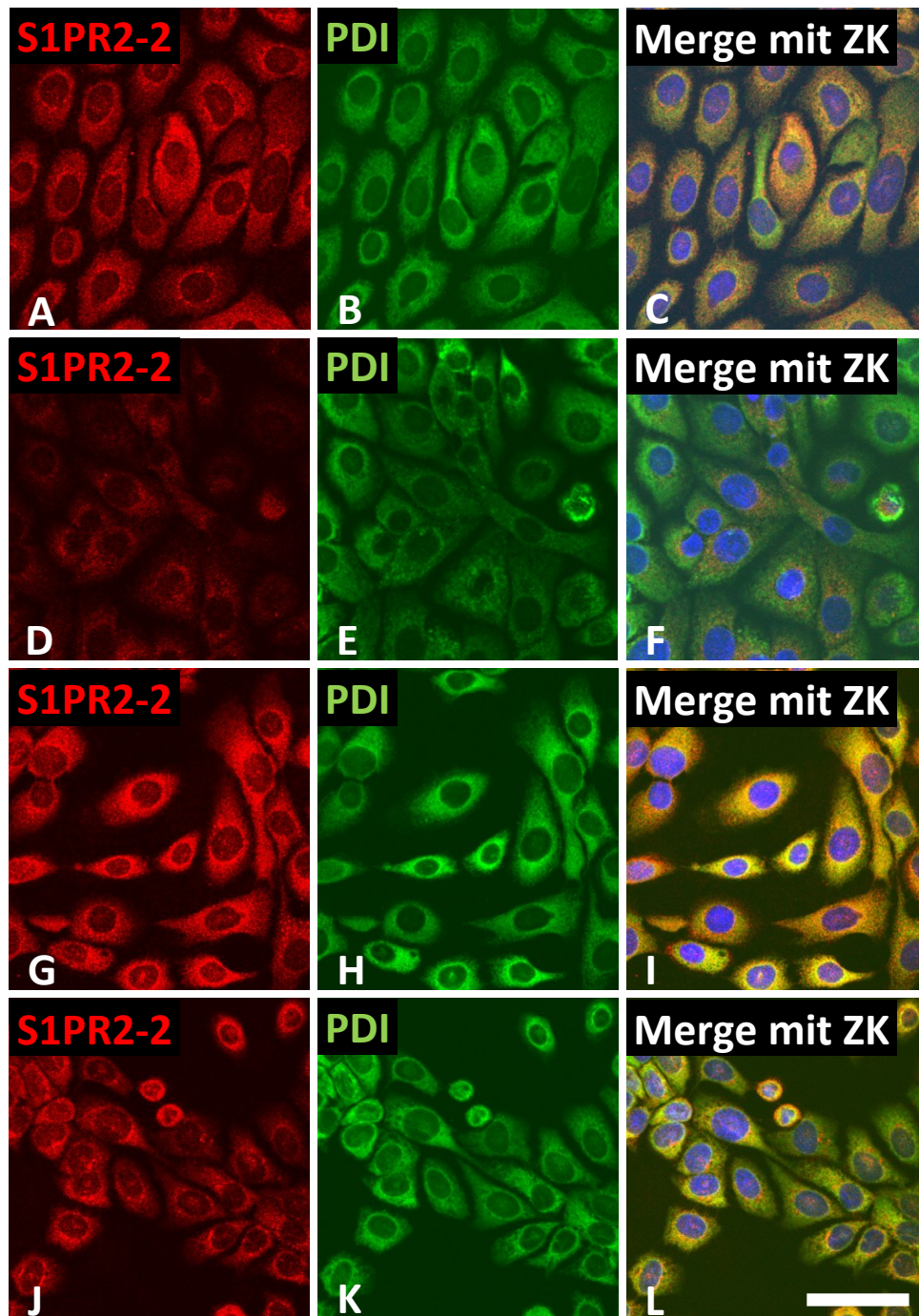


Abbildung 11: Lokalisation von S1PR2 mittels Immunfluoreszenzfärbung in HuCCA1 Zellen. Ein Antikörper gegen PDI (in grün) wurde als Marker für das endoplasmatische Retikulum verwendet. Die Zellkerne (ZK) wurden mit Hoechst in blau dargestellt. A-C: Kontrollbedingungen. D-F: Stimulation mit TCA 100µM über 24 Stunden. G-I: Stimulation mit JTE013 10µM über 24 Stunden. J-L: Stimulation mit TCA und JTE013. Balken = 50µm.

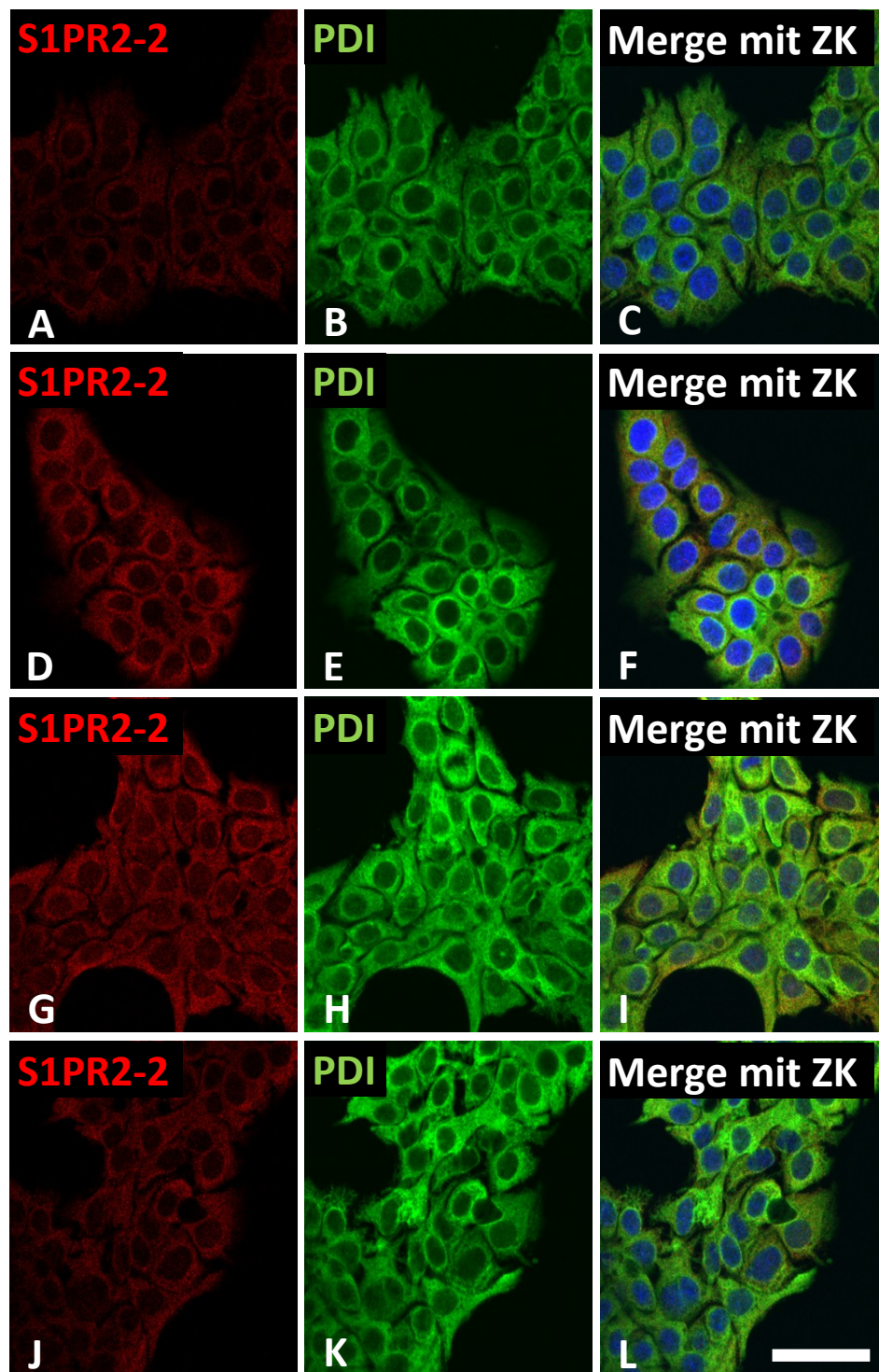


Abbildung 12: Lokalisation von S1PR2 mittels Immunfluoreszenzfärbung TFK Zellen. Ein Antikörper gegen PDI (in grün) wurde als Marker für das endoplasmatische Retikulum verwendet. Die Zellkerne (ZK) wurden mit Hoechst in blau dargestellt. A-C: Kontrollbedingungen. D-F: Stimulation mit TCA 100µM über 24 Stunden. G-I: Stimulation mit JTE013 10µM über 24 Stunden. J-L: Stimulation mit TCA und JTE013. Balken = 50µm.

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von S1PR2 in den verschiedenen CCC Zelllinien wurden Immunfluoreszenzfärbungen unter Stimulationsbedingungen mit S1PR2 Liganden bzw. Antagonisten durchgeführt. Ein Antikörper gegen PDI wurde als Marker für das Endoplasmatische Retikulum eingesetzt.

Erneut ist in den verwendeten Cholangiokarzinomzelllinien HuCCT1 (Abb.10), HuCCA1 (Abb.11) und TFK (Abb.12) unter Stimulation mit TCA (jeweils D-F) eine Veränderung des S1PR2 Signals zu beobachten. Gleichmaßen verändert sich das S1PR2 Signal unter Inhibition mit JTE013 (G-I) in den verwendeten Cholangiokarzinomzelllinien. In J-L kommt es ebenfalls zu Veränderungen des S1PR2 Signals unter Stimulation mit TCA und Inhibition mit JTE013 der Cholangiokarzinomzelllinien HuCCT1 (Abb.11), HuCCA1 (Abb.12) und TFK (Abb.13).

In Abbildung 10 wurde im Unterschied zu den Abbildungen 11 und 12 der anti-S1PR2-1-Antikörper verwendet.

S1PR2 kann in allen verwendeten Cholangiokarzinomzelllinien im Endoplasmatischen Retikulum, in Kolokalisation mit PDI nachgewiesen werden. Darüber hinaus finden sich vesikuläre, PDI-negative Strukturen, die a.e. sekretorischen Vesikeln entsprechen. Folglich liegt S1PR2 neben der unter 4.1.1 genannten Plasmamembran in weiteren verschiedenen Zellkompartimenten vor.

In weiteren Bestimmungen der Lokalisation von S1PR2 wurden in Abbildung 13 Immunfluoreszenzfärbungen von S1PR2 in murinem Lebergewebe angefertigt. Als Gegenfärbung zu S1PR2 wurde ein Antikörper gegen Zytokeratin 19 (CK19) als Marker für Cholangiozyten verwendet.

Insgesamt sind in der Abbildung 13 drei Kryoschnitte von murinen Wildtyp Lebern zu sehen, wobei die jeweiligen Gallengänge in der jeweils oberen Zeile (A-C, G-I und M-O) zweifach vergrößert und teils auch gedreht veranschaulicht sind. Nicht nur der jeweilige Kryoschnitt ändert sich unter A-F, G-L und M-R, sondern auch der jeweils verwendete S1PR2-1 bzw. S1PR2-2 -Antikörper in der genannten Verdünnung.

Aus der Überlagerung (Merge) des S1PR2 Signals mit dem CK19 Signal kann geschlussfolgert werden, dass S1PR2 in murinen Lebern auch in Cholangiozyten lokalisiert ist. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass S1PR2 in weiteren Zelltypen der Mausleber exprimiert wird.

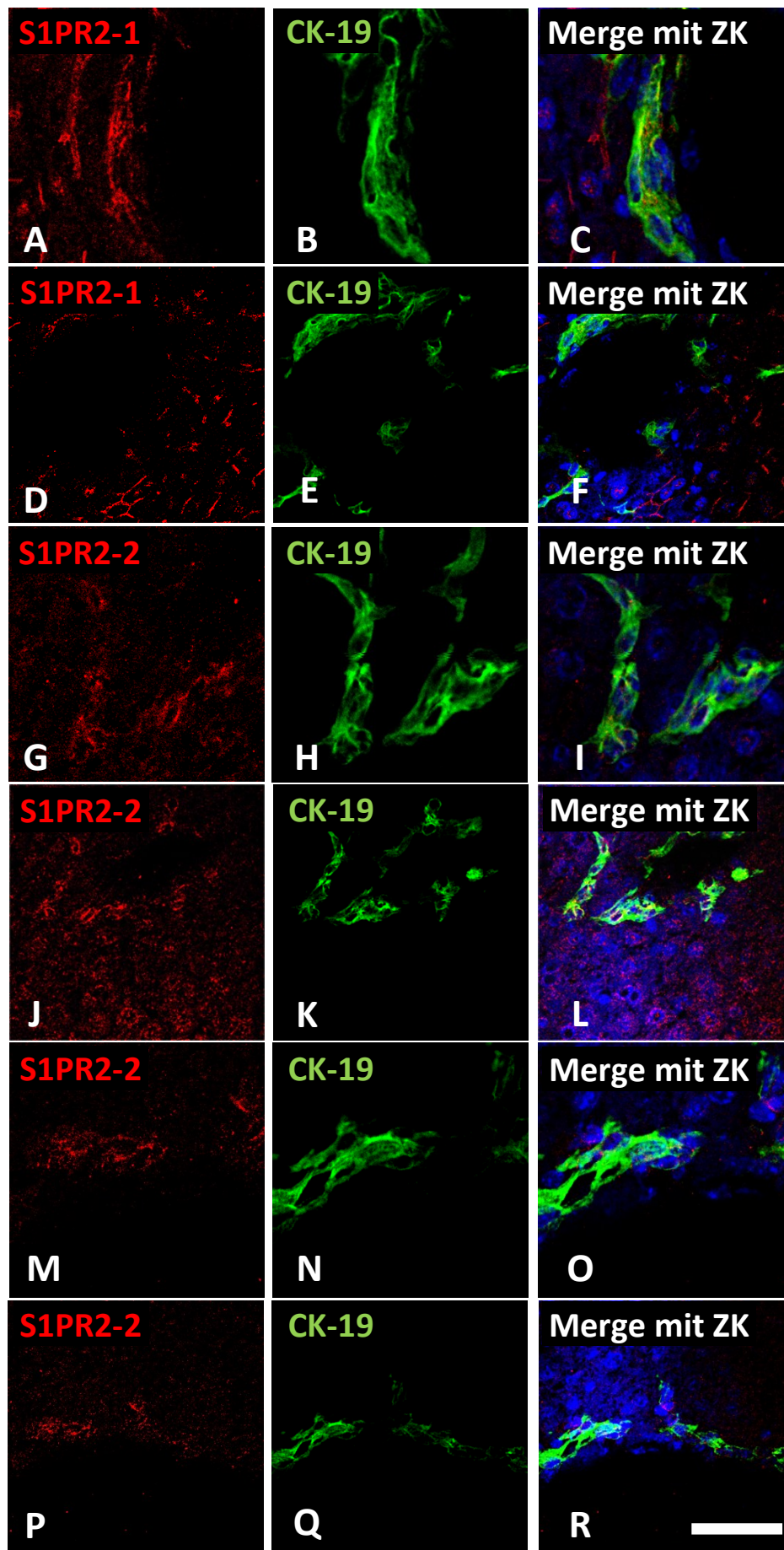


Abbildung 13: Lokalisation von S1PR2 in murinem Lebergewebe in Vergrößerung (A-C, G-I, M-O) und in der Übersicht (D-F J-L, P-R). CK19 (in grün) wurde als Marker für die Cholangiozyten verwendet. Die Zellkerne (ZK) wurden mit Hoechst in blau dargestellt. (Balken = 100µm für A-C, G-I und M-O) (Balken = 200µm für D-F, J-L und P-R).

4.4 Funktionelle Untersuchungen zu S1PR2 und TGR5

4.4.1 Phospho-ERK Proteinmenge mittels Western Blot

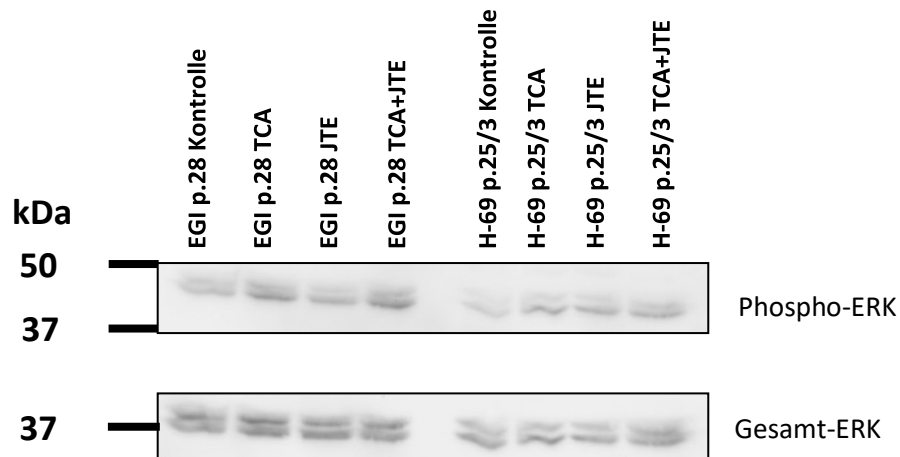


Abbildung 14: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK von EGI und H-69 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 μ mol, 30 min), JTE (10 μ mol, 30 min) bzw. TCA+ JTE.

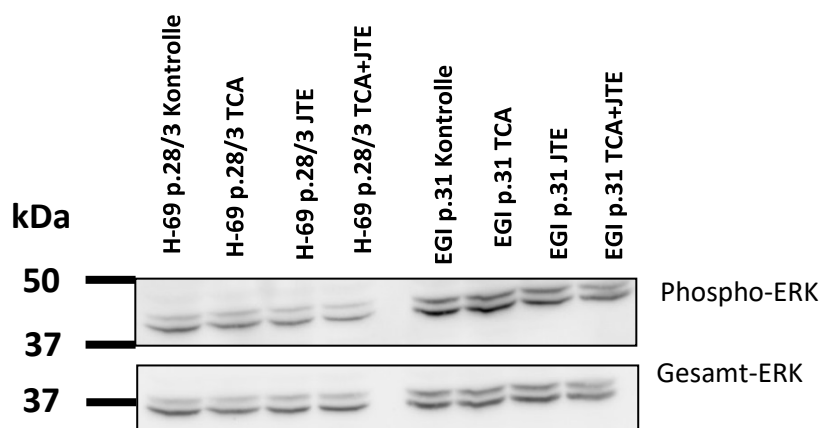


Abbildung 15: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK von EGI und H-69 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 μ mol, 30 min), JTE (10 μ mol, 30 min) bzw. TCA+ JTE.

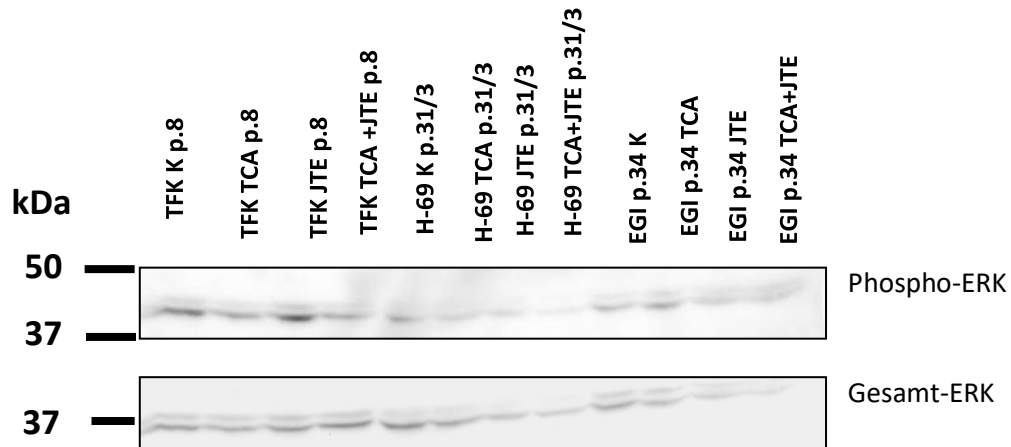


Abbildung 16: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in TFK, H-69 und EGI unter Kontrollbedingungen (K) bzw. nach Stimulation mit TCA (100 μ mol, 30 min), JTE (10 μ mol, 30 min) bzw. TCA+JTE.

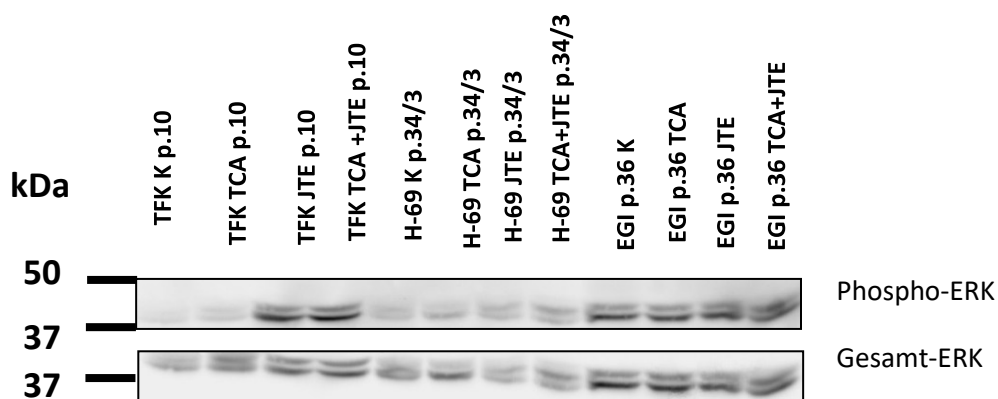


Abbildung 17: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in TFK, H-69 und EGI unter Kontrollbedingungen (K) bzw. nach Stimulation mit TCA (100 μ mol, 30 min), JTE (10 μ mol, 30 min) bzw. TCA+JTE.

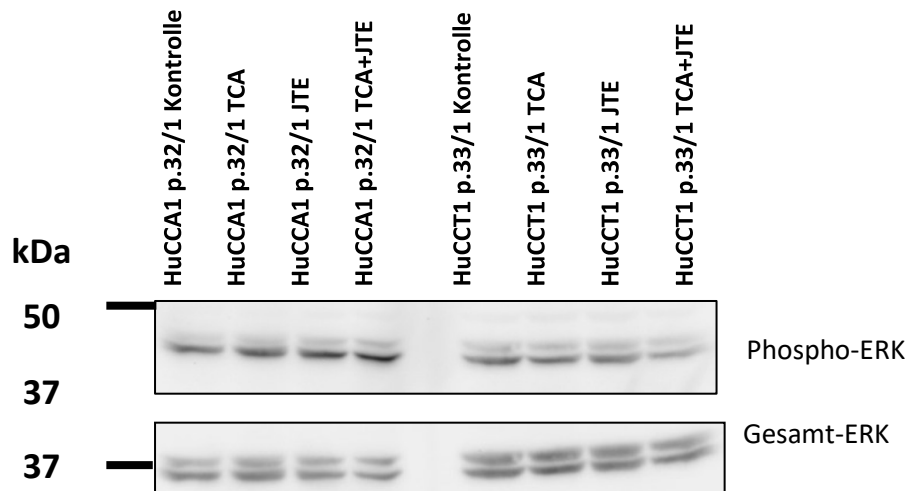


Abbildung 18: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in HuCCA1 und HuCCT1 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 μ mol, 30 min), JTE (10 μ mol, 30 min) bzw. TCA + JTE

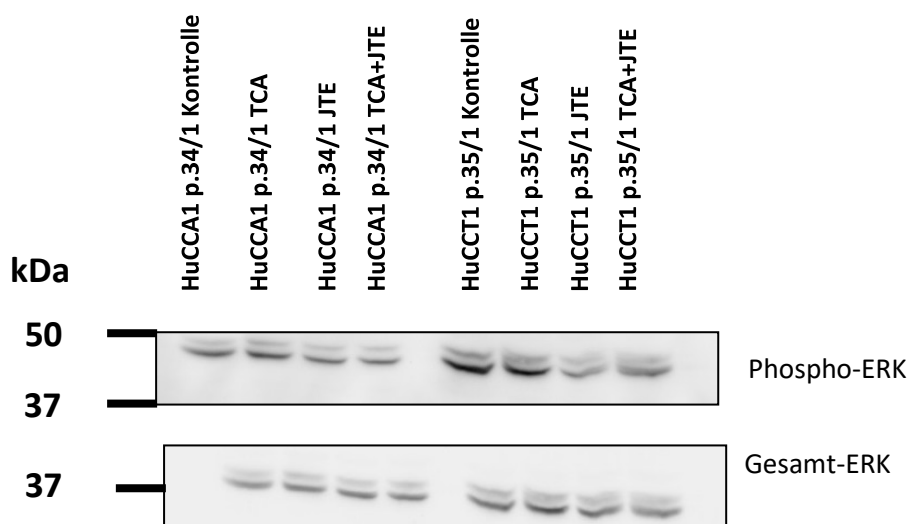


Abbildung 19: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in HuCCA1 und HuCCT1 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 μ mol, 30 min), JTE (10 μ mol, 30 min) bzw. TCA + JTE.

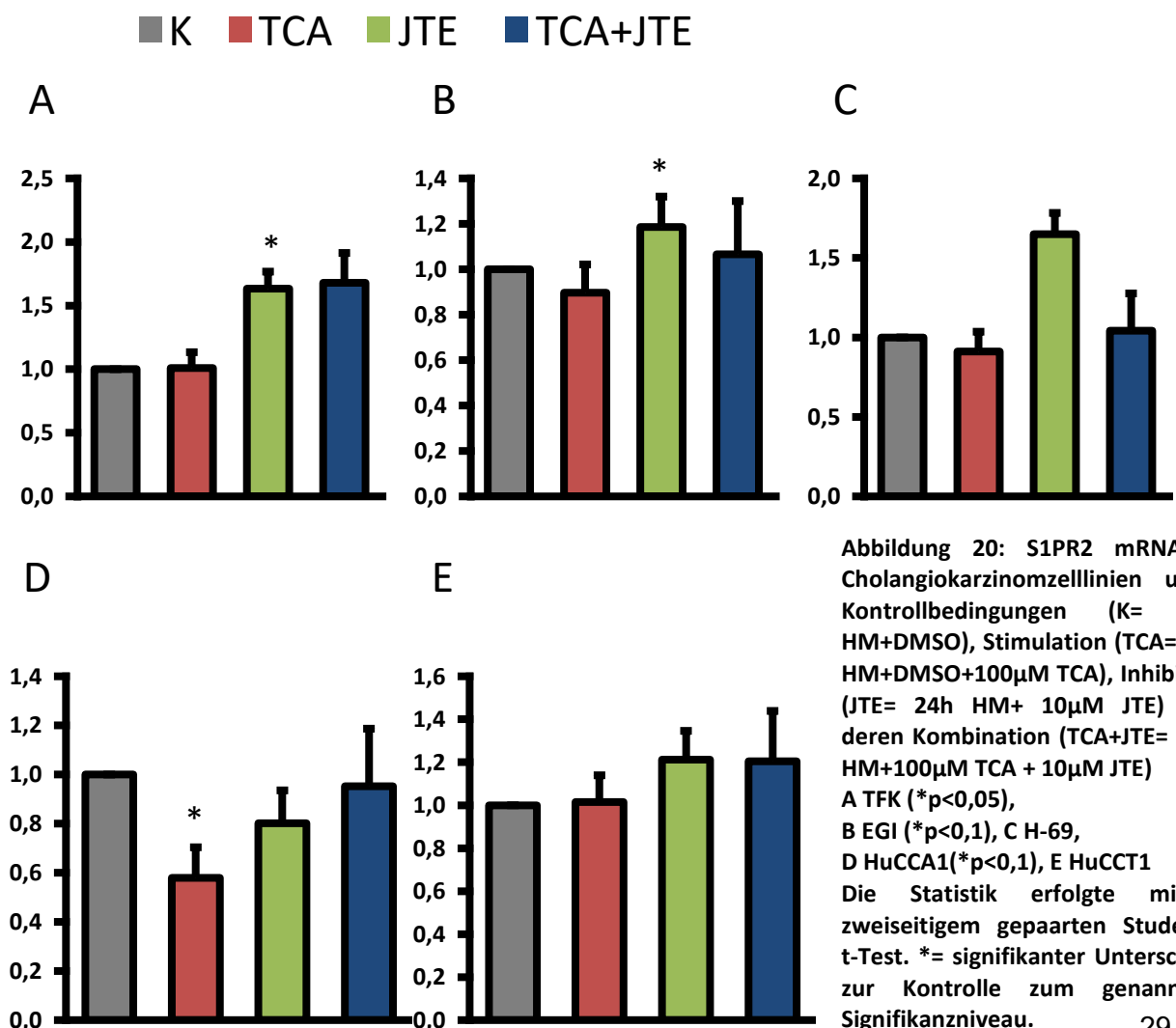
Um die Auswirkung von Taurocholsäure, JTE013 und deren Kombination auf die Proteinmenge von Phospho-/ERK in Cholangiokarzinomzelllinien zu analysieren, wurden Western Blots angefertigt.

Hierbei wurden jeweils mindestens fünf Passagen von den fünf genannten Cholangiokarzinomzelllinien verwendet. Als Kontrolle diente eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von JTE013. Abbildungen 14-19 zeigen repräsentative Western Blots.

Während Taurocholsäure die Proteinmenge von Phospho-/ERK in den Cholangiokarzinomzelllinien zu steigern scheint, hatte JTE013 auf die Proteinmenge von Phospho-/ERK in einigen Zelllinien eine inhibitorische Wirkung. Das jeweilige Ausmaß variierte dabei unter den Cholangiokarzinomzelllinien, was im Einklang mit den Aussagen in der Literatur zu JTE013 ist (siehe Kap. 3.1.5).

Somit ist festzuhalten, dass Taurocholsäure eine eher stimulierende und JTE013 eine eher inhibierende Auswirkung auf die Phospho-/ERK Proteinmenge in Cholangiokarzinomzelllinien hat, die jedoch unter den einzelnen Zelllinien verschieden ist.

4.4.2 mRNA Expression in der Real-Time-PCR



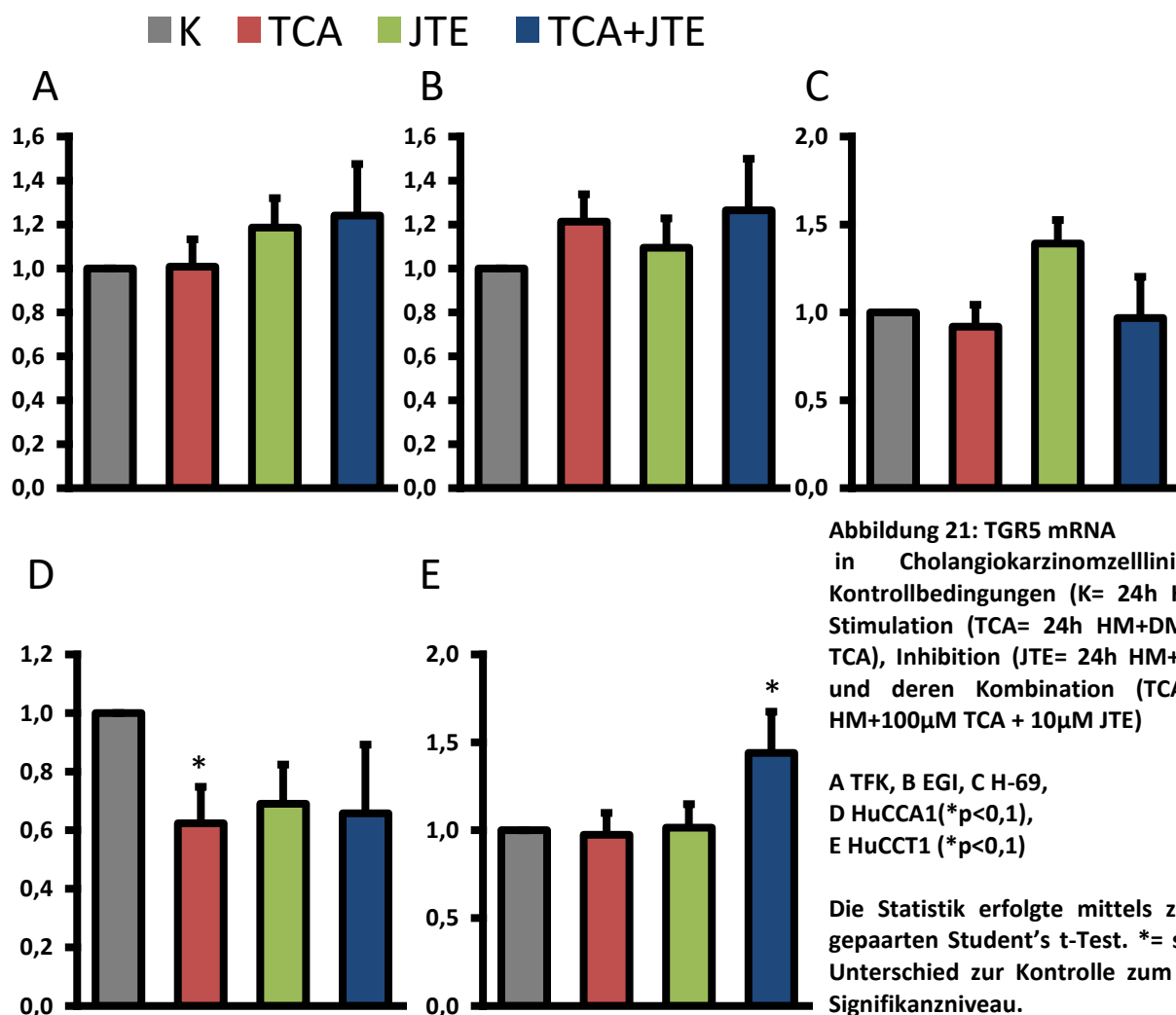
Um zu überprüfen, ob die Stimulation mittels Taurocholsäure, die Inhibition mittels JTE013 oder deren Kombination die S1PR2 mRNA Expression verändert, wurden Cholangiokarzinomzelllinien in der Real-Time-PCR untersucht.

Hierbei steigerte sich unter Inhibition mittels JTE013 die S1PR2 mRNA Expression gegenüber der Kontrolle in den Cholangiokarzinomzelllinien TFK ($p < 0.05$) und EGI ($p < 0.1$) signifikant. Auch in C und E bei den Zelllinien H-69 und HuCCT1 konnte die Tendenz zur Steigerung der mRNA Expression von S1PR2 gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

Ausschließlich in der Cholangiokarzinomzelllinie HuCCA1 wurde unter Stimulation mit Taurocholsäure eine signifikante Senkung der S1PR2 mRNA Expression ($p < 0.1$) festgestellt.

In der Kombination aus Stimulation und Inhibition mittels Taurocholsäure und JTE013 wurden in keiner der Cholangiokarzinomzelllinie signifikante Veränderungen gefunden.

Insgesamt ist festzuhalten, dass Stimulation bzw. Inhibition des S1PR2 Rezeptors abhängig von der Cholangiokarzinomzelllinie einen teils signifikanten Einfluss auf die mRNA Expression von S1PR2 hat.



Um zu überprüfen, ob die Stimulation mittels Taurocholsäure, die Inhibition mittels JTE013 oder deren Kombination auch die TGR5 mRNA Expression verändert, wurden Cholangiokarzinomzelllinien in der Real-Time-PCR untersucht.

Hierbei muss beachtet werden, dass während die Taurocholsäure sowohl den S1PR2-, als auch den TGR5 Rezeptor stimuliert [64, 79], JTE013 ausschließlich den S1PR2 Rezeptor inhibiert [50].

Während die Kombination aus Stimulation und Inhibition in Abbildung 20 keine signifikanten Veränderungen auf die S1PR2 mRNA hatte, findet sich hier unter E eine signifikante Steigerung der TGR5 mRNA Expression ($p < 0,1$) unter eben diesen Bedingungen. Daher ist davon auszugehen, dass die fehlende Inhibition von JTE013 auf den TGR5 Rezeptor und dementsprechend die weiterhin in der Kombination vorhandene Stimulation über die Taurocholsäure auf den TGR5 Rezeptor ein entscheidender Faktor ist.

Während JTE013 in Abbildung 20 eine teils signifikante Steigerung der S1PR2 mRNA Expression bewirkt, hat hier die inhibitorische Wirkung von JTE013 auf die TGR5 mRNA Expression keinen signifikanten Einfluss. Jedoch liegt unter A, B und C bei den Zelllinien TFK, EGI und H-69 eine Tendenz zur Steigerung der TGR5 mRNA Expression unter Inhibition des S1PR2 Rezeptors mit JTE013 vor, was einen gegenläufigen, kompensatorischen Zusammenhang im Sinne einer Redundanz andeuten kann.

Wie in Abbildung 20 senkt die Stimulation mit Taurocholsäure ausschließlich in der HuCCA1-Zelllinie signifikant ($p < 0,1$) die mRNA Expression in diesem Fall von TGR5. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass diese Auffälligkeiten mit der individuellen Zelllinie in Verbindung stehen.

Insgesamt verändern die gegebenen Untersuchungsbedingungen die TGR5 mRNA Expression in zwei Fällen signifikant. Zusammen mit der Abbildung 20 lässt sich in der Deutung ein Zusammenhang zwischen der Taurocholsäure und JTE013 auf der einen Seite und S1PR2 und TGR5 auf der anderen Seite herstellen.

4.5 Detektion von S1PR2 und TGR5 im humanen Cholangiokarzinomgewebe

4.5.1 S1PR2 Proteinmenge mittels Western Blot

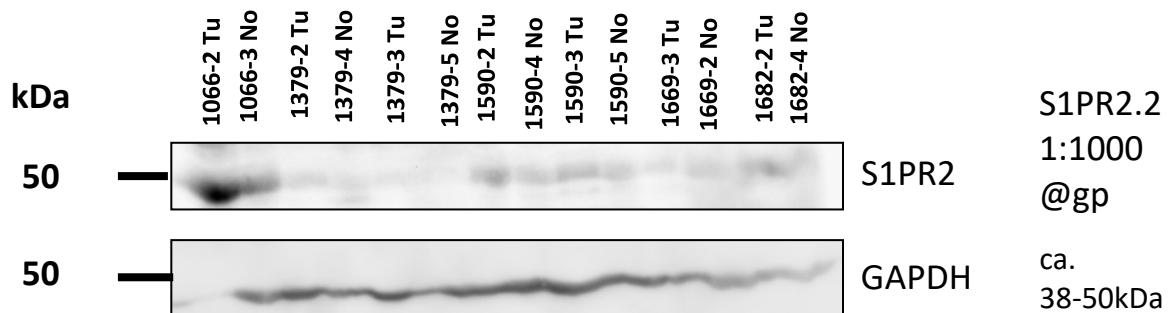


Abbildung 22: S1PR2 Proteinmenge von Cholangiokarzinom Patienten vs. Randgewebe als Kontrolle des jeweils selben Patienten. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

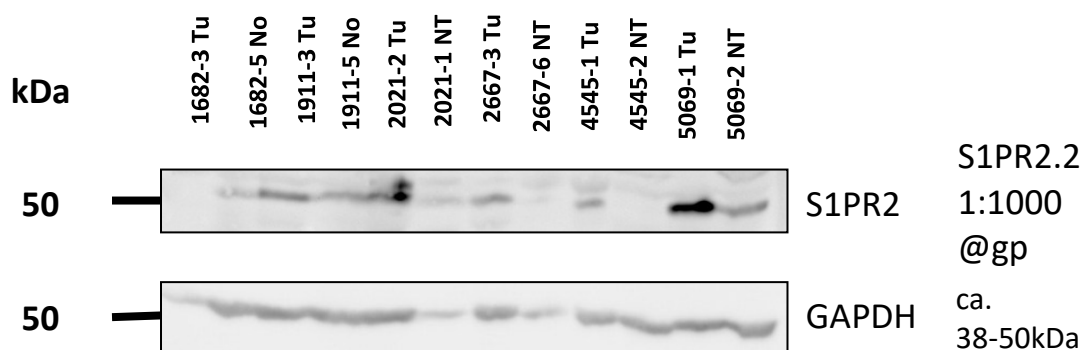


Abbildung 23: S1PR2 Proteinmenge von Cholangiokarzinom Patienten vs. Randgewebe als Kontrolle des jeweils selben Patienten. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Bei der Mehrzahl der zehn Cholangiokarzinom Patienten ist im Western Blot eine erhöhte S1PR2 Proteinmenge im Vergleich zwischen der Gewebeprobe aus dem Cholangiokarzinom gegenüber dem makroskopisch gesunden Randbereich zu finden, wobei von drei Patienten jeweils zwei Probenpaare analysiert wurden.

Dabei ist das jeweilige Verhältnis zwischen S1PR2 Proteinmenge im Tumor gegenüber der Kontrolle unterschiedlich, was als Zeichen der intertumoralen Heterogenität gewertet werden kann.

Besonders genannt werden können die Proben 5069-1/5069-2 und 1066-2/3, da hier ein auffällig großes Signal hinsichtlich des Verhältnisses der S1PR2 Proteinmenge besteht.

4.5.2 in der Immunfluoreszenzfärbung

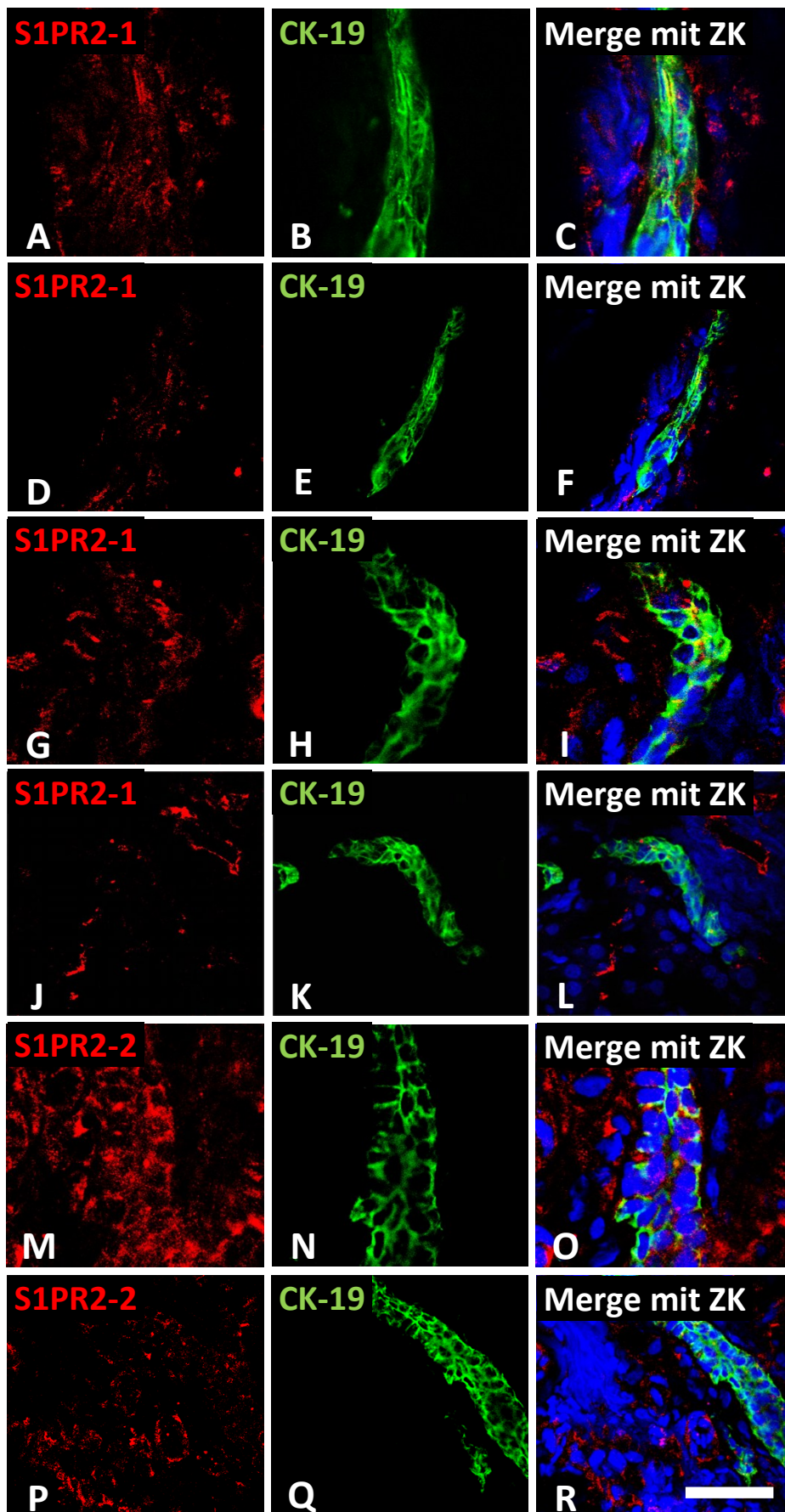


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von humaner Leber mit Antikörpern gegen S1PR2 und CK-19. Letzteres diente als Marker für Cholangiozyten. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (in blau) angefärbt.

Balken = 100µm für A-C, G-I und M-O Balken = 200µm für D-F, J-L und P-R.

Um S1PR2 in der humanen Leber zu lokalisieren, erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen mit der Gegenfärbung gegen CK-19, welches Cholangiozyten markiert.

In der Abbildung 24 sind drei Leber-Kryoschnitte einer humanen Leberprobe dargestellt, wobei der Gallengang jeweils in der oberen Zeile zweifach vergrößert veranschaulicht ist. Der erste Leber-Kryoschnitt (A-F) wurde im doppelten Verhältnis des anti-S1PR2-1 -Antikörpers zum zweiten Leberkryoschnitt (G-L) gefärbt. Im dritten Leber-Kryoschnitt (M-R) erfolgte eine Färbung mit dem anti-S1PR2-2 Antikörper im Verhältnis 1:100.

Insgesamt findet sich ein Teil des S1PR2 Signals in Kolokalisation mit dem CK-19 Signal, analog der murinen Leber. Darüber hinaus findet sich aber S1PR2 in weiteren, CK-19 negativen Zellen.

Um das S1PR2 Signal in humanen Cholangiokarzinomproben den jeweiligen makroskopisch gesunden Randbereichen von demselben Patienten gegenüber zu stellen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, in denen ebenfalls CK-19 als Marker für die Cholangiozyten diente.

Dabei ist die jeweils maligne Probe in der oberen Zeile (Abb. 37, A-C, G-I und M-O) und die benigne Probe desselben Patienten in der unteren Zeile (D-F, J-L und P-R) zu sehen. Für die Proben des ersten und zweiten Patienten wurde der anti-S1PR2-1 -Antikörper im gleichen Verhältnis verwendet, für die Proben des dritten Patienten wurde der anti-S1PR2-2 -Antikörper im gleichen Verhältnis genutzt.

Insgesamt ist eine Zunahme der S1PR2-, sowie CK-19 Signale in den Cholangiokarzinomproben gegenüber den makroskopisch gesunden Randbereichen (Kontrollen) desselben Patienten festzuhalten. Neben dieser Zunahme durchbricht das Cholangiokarzinom die physiologische Architektur der Gallengänge gegenüber den Kontrollen. Die maligne Struktur unter den einzelnen Cholangiokarzinomen (A-C, G-I und M-O) von verschiedenen Patienten folgt keinem festen Muster, sondern zeichnet sich durch die Unordnung der malignen Transformation aus. Die Zunahme der Signale in den malignen Proben verdeutlicht die Co-Lokalisierung der S1PR2- und CK-19 Signale nochmals.

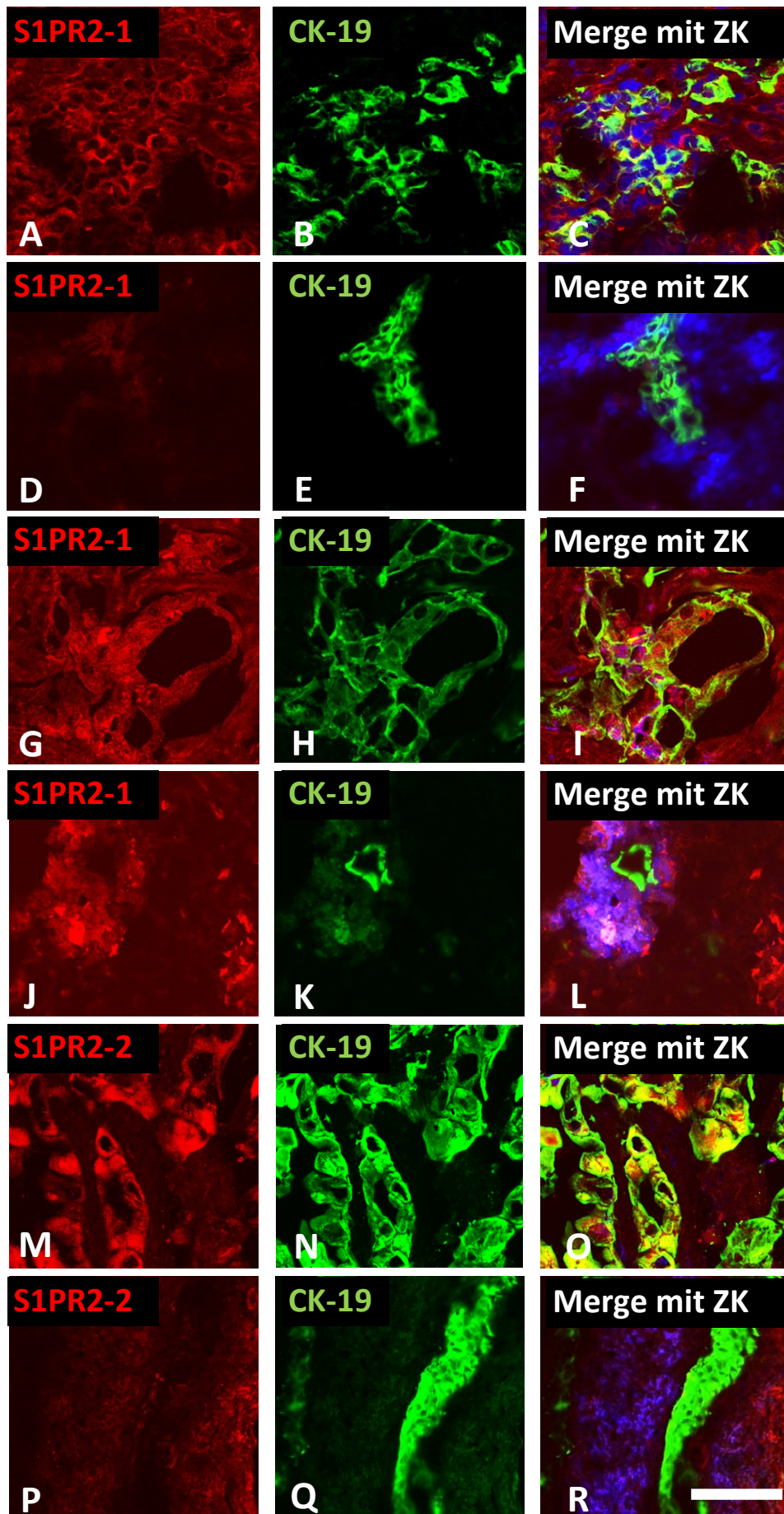


Abbildung 25:
Immunfluoreszenzfärbungen
von jeweils CCC und
Kontrollgewebe dreier
Patienten mit Antikörpern
gegen S1PR2 und CK-19.
Letzteres diente als Marker für
Cholangiozyten. Die Zellkerne
wurden mit Hoechst (in blau)
angefärbt. Balken = 200µm.

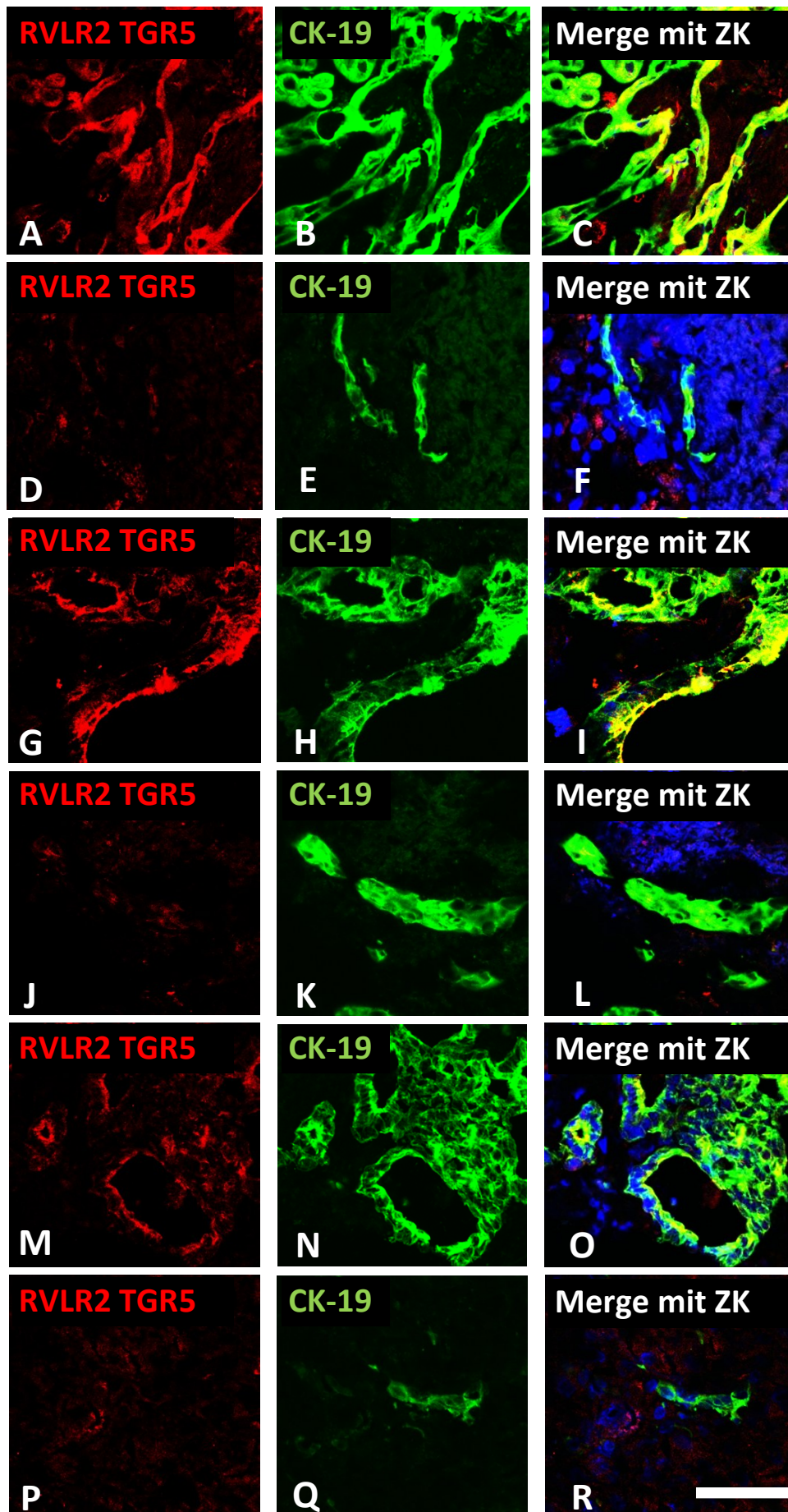


Abbildung 26:
Immunfluoreszenzfärbungen
von jeweils CCC und
Kontrollgewebe dreier
Patienten mit Antikörpern
gegen TGR5 (RVLR2) und CK-
19. Letzteres diente als
Marker für Cholangiozyten.
Die Zellkerne wurden mit
Hoechst (in blau) angefärbt.
Balken = 200µm.

Um das TGR5 Signal in humanen Cholangiokarzinomproben den jeweiligen makroskopisch gesunden Randbereichen von demselben Patienten gegenüber zu stellen, wurden ebenfalls Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, in denen nochmals eine CK-19-Färbung zur Markierung der Gallengänge erfolgte.

Damit ist auch eine Gegenüberstellung der jeweils gleichen Vorgänge unter den Abbildungen 25 sowie 26 und somit unter den S1PR2 sowie TGR5 Signalen möglich.

Dabei ist erneut die jeweils maligne Probe in der oberen Zeile (A-C, G-I und M-O) und die benigne Probe desselben Patienten in der unteren Zeile (D-F, J-L und P-R) zu sehen. Für alle Proben wurde der RVLR2-Antikörper im Verhältnis 1:250 als TGR5-Marker verwendet.

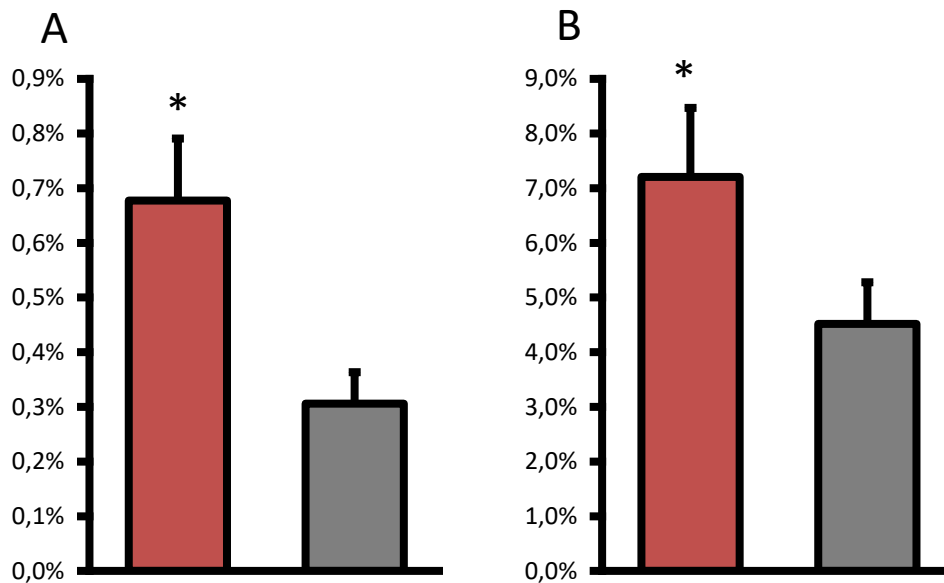
Insgesamt ist eine Zunahme der TGR5-, sowie erneut der CK-19 Signale in den Cholangiokarzinomproben gegenüber den makroskopisch gesunden Randbereichen (Kontrollen) desselben Patienten festzuhalten. Neben dieser Zunahme liegt auch hier eine Durchbrechung der physiologischen Architektur der Gallengänge von den Cholangiokarzinomproben gegenüber den Kontrollen vor. Die maligne Struktur unter den einzelnen Cholangiokarzinomen (A-C, G-I und M-O) von verschiedenen Patienten folgt erneut keinem festen Muster, sondern zeichnet sich ebenfalls durch die Unordnung der malignen Transformation aus. Die Zunahme der Signale in den malignen Proben verdeutlicht die Co-Lokalisierung der TGR5- und CK-19 Signale erneut.

Deshalb können die Abbildungen 25 sowie 26 und damit auch die S1PR2 sowie TGR5 Signalveränderungen zwischen den humanen Cholangiokarzinomproben und Kontrollen gegenübergestellt werden, da diese vergleichbar sind. Da die Antiseren gegen TGR5 als auch S1PR2 im Meerschweinchen generiert wurden, ist die gleichzeitige Anfärbung beider Rezeptoren mit diesen Seren nicht möglich gewesen.

4.5.3 S1PR2- und TGR5 mRNA Expression in der Real-Time-PCR

■ CCC (n=12) ■ NO (n=12)

S1PR2



TGR5

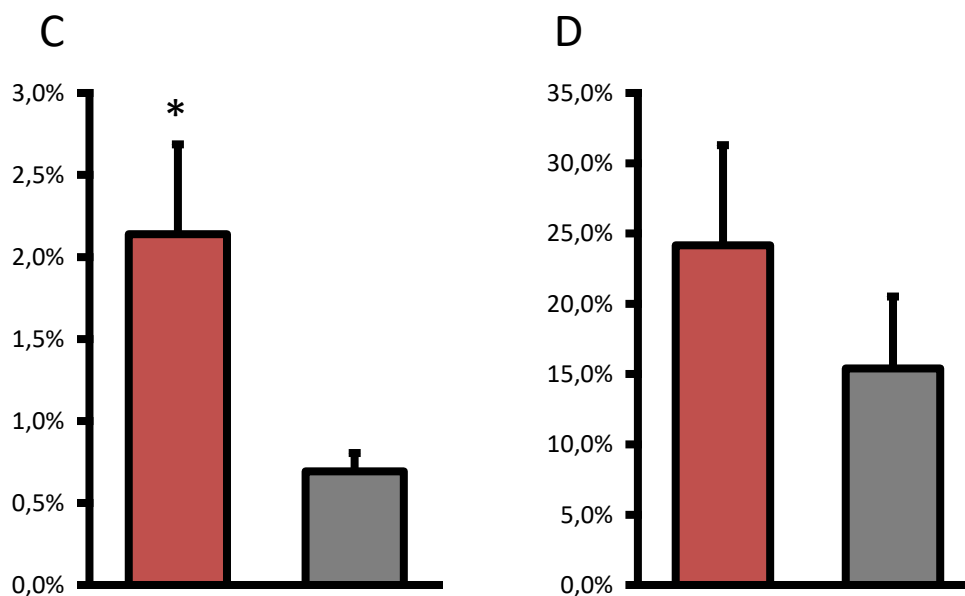


Abbildung 27: Detektion von S1PR2 und TGR5 mRNA Expression in humanen Cholangiokarzinomgewebe (CCC) bzw. nicht-tumorösen Randgewebe (NO). Die mRNA Expression wurde in Relation zu SDHA (A, C) bzw. HPRT dargestellt (B, D) (n=12 Paare). Die Statistik erfolgte mittels zweiseitigem ungepaarten Student's t-Test. *= signifikanter Unterschied versus nicht-tumorösem Randgewebe zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Die S1PR2 mRNA Expression ist bei den humanen Cholangiokarzinomen gegenüber den makroskopisch gesunden Randbereichen der jeweils selben Patienten bezogen auf beide Housekeeping-Gene SDHA und HPRT signifikant größer (jeweils $p < 0,05$, $n=12$).

Die TGR5 mRNA Expression ist ebenfalls bei den humanen Cholangiokarzinomen gegenüber den makroskopisch gesunden Randbereichen der jeweils selben Patienten bezogen auf das Housekeeping-Gen SDHA signifikant größer ($p < 0,05$). Bezogen auf das Housekeeping Gen HPRT wird diese Tendenz bestätigt. Insgesamt ist auffällig, dass die TGR5 mRNA Expression sowohl im nicht-tumorösen Randgewebe als auch im Tumorgewebe deutlich höher liegt als die S1PR2 Expression.

5 Diskussion

5.1 S1PR2 wird von Cholangiozyten und Cholangiokarzinomzelllinien exprimiert

S1PR2 wird von primär murinen Cholangiozyten (Abb. 5 und 7) und von intra- und extrahepatischen humanen Cholangiokarzinomzelllinien (Kap. 4.3.1 und Abb. 4) auf mRNA-Ebene und Proteinebene exprimiert. Letzteres konnte mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit erstmals charakterisierten Antiseren gegen S1PR2 nachgewiesen werden. Im humanen Cholangiokarzinomgewebe wurde eine Überexpression von S1PR2 gefunden (Kap. 4.5.1 und 4.5.3), was im Einklang mit bisher publizierten Daten steht [31].

Auch TGR5 ist im humanen Cholangiokarzinomgewebe gegenüber dem makroskopisch gesunden Randgewebe überexprimiert [33] (Kap. 4.5.3), weshalb beide Rezeptoren von besonderem Interesse sind. Sowohl der S1PR2- [1], als auch der TGR5 Rezeptor [63] vermitteln Proliferation im Cholangiokarzinom. Damit liegen funktionell bezüglich beider Rezeptoren redundante Signalwege vor. In der Gesamtheit war dies auf Grund der bisherigen Literatur zu vermuten, wurde allerdings noch nie systematisch untersucht.

Der S1PR2 Rezeptor wurde im Gegensatz zum meist in der Plasmamembran zu detektierenden TGR5 Rezeptor [39] mit den hier verwendeten Antiseren vornehmlich intrazellulär lokalisiert (Kap. 4.3.2) und war nur nach Transfektion vorrangig in der Plasmamembran zu finden (Kap. 4.1.1), wobei durch die Transfektion eine 300-400-fach höhere S1PR2 mRNA Expression [81] und somit keine physiologische Expression des S1PR2 Rezeptors vorlag.

Der S1PR2 Rezeptor wurde bereits durch eine andere Arbeitsgruppe intrazellulär lokalisiert, welche dies auf die rapide Internalisierung in zytoplasmatischen Vesikeln nach der Stimulation zurückgeführt hat [53]. Allerdings belegen die Kofärbungen der vorliegenden Arbeit, dass S1PR2 in Cholangiokarzinomzelllinien vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum zu finden war. Im Gegensatz hierzu wäre eine intrazelluläre Lokalisation nach Stimulation in endosomalen Strukturen zu erwarten [53]. Deshalb bleibt für den S1PR2 Rezeptor letztlich unklar, ob dieser von extra- oder intrazellulären Gallensäuren aktiviert wird. Konjugierte, hydrophile Gallensäuren als Liganden für den S1PR2 Rezeptor [57] können an der apikalen Cholangiozytenmembran über den Natrium-abhängigen Gallensäuren-Co-Transporter ASBT in die Zelle gelangen [72]. ASBT wird jedoch ausschließlich von großen Cholangiozyten/Gallengängen (>15µm Durchmesser im Lumen [61]) und nicht von kleinen Cholangiozyten/Gallengängen exprimiert [72].

Unter der Annahme der intrazellulären Aktivierung würde die Expression von ASBT die Sensitivität des Cholangiozyten bezüglich des S1PR2 Signalweges bestimmen [72].

5.2 TGR5-Defizienz bewirkt eine Induktion der S1PR2 mRNA Expression

In der Literatur wurde die Expression von TGR5 und S1PR2 bisher getrennt betrachtet. Eine mögliche Ursache ist die bislang fehlende Verfügbarkeit hochwertiger kommerzieller Antikörper gegen beide Rezeptoren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob TGR5 und S1PR2 gleichzeitig von Cholangiozyten und Cholangiokarzinomzellen exprimiert werden und welchen Einfluss die Defizienz von TGR5 auf die S1PR2 Expression hat. S1PR2 konnte in Cholangiozyten und sämtlichen CCC Zelllinien, in den zuvor auch TGR5 nachgewiesen wurde, detektiert werden. Interessanterweise, fand sich sowohl in einer TGR5-defizienten CCC Zelllinie, als auch in TGR5-defizienten murinen Cholangiozyten eine signifikante Induktion der S1PR2 mRNA Expression (Kap. 4.2.2).

Letzteres könnte darauf hindeuten, dass die Expression eines membranständigen Gallensäurerezeptors für Cholangiozyten bzw. CCC Zellen essentiell ist und somit die redundante Expression beider Rezeptoren wichtige Zellfunktionen absichert. Die Analyse von TGR5/S1PR2 Doppelknockout Mäusen bzw. -defizienten Zelllinien kann zukünftig zur Klärung dieser offenen Frage beitragen.

5.3 Bedeutung von S1PR2 und TGR5 beim Cholangiokarzinom

Sowohl der S1PR2-, als auch der TGR5 Rezeptor sind im humanen Cholangiokarzinomgewebe gegenüber dem makroskopisch gesunden Randgewebe überexprimiert (Kap. 4.5). Interessanterweise war die mRNA Expression von TGR5 hierbei sowohl im Tumor- als auch im gesunden Randgewebe höher als die von S1PR2.

Das Cholangiokarzinom kommt unter Cholestase wie z.B. bei der Primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) oder der Hepatolithiasis signifikant vermehrt vor [15]. Auch die durch den Tumor selbst bedingte mechanische Obstruktion kann zu einer Akkumulation von Gallensäuren und somit zu einer Cholestase führen [15].

Der S1PR2 Rezeptor (Kap.4.4.1) und der TGR5 Rezeptor, gekoppelt an ein Gs-Protein [41], aktivieren den ERK Signalweg auf ähnliche Weise und vermitteln so Proliferation, weshalb die Cholestase als Progressionsfaktor für das Cholangiokarzinom von Bedeutung sein kann.

Hierzu passen auch frühere Arbeiten die eine Rolle von TGR5 als auch S1PR2 nicht nur für die Gallensalz-abhängige Proliferation von CCC Zellen, sondern auch für deren Migration und Invasivität belegen [1, 62, 66].

Die Immunfluoreszenzfärbungen der aktuellen Arbeit legen nahe, dass S1PR2 als auch TGR5 nicht ausschließlich in den Karzinomzellen beim CCC vorkommen, sondern auch von anderen Zelltypen exprimiert werden. Unter physiologischen Bedingungen wurden S1PR2 als auch TGR5 in der Leber in Sinusendothelzellen, Makrophagen und Cholangiozyten

nachgewiesen [1, 11, 38, 57, 66, 69, 79, 82, 83]. Im Gegensatz zu TGR5, ist S1PR2 auch in Hepatozyten und ruhenden hepatischen Sternzellen nachweisbar [38, 66, 69, 79]. Welche Rolle die Expression der Rezeptoren in diesen Zelltypen für die Entstehung und Progression des CCC spielt, ist unklar. Insbesondere, die Expression der Rezeptoren in Makrophagen sowie aktivierten Fibroblasten in der Tumorumgebung könnte für die CCC Pathogenese von Bedeutung sein [84].

Sowohl S1PR2 als auch TGR5 sind auch in anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes nachweisbar. So wurde kürzlich beschrieben, dass S1PR2 von Adenokarzinomzellen des Pankreas exprimiert wird und konjugierte Gallensäuren hier ebenfalls die Proliferation als auch die Metastasierung fördern [85]. Auch für TGR5 findet sich eine hohe Expression in Adenokarzinomen des Pankreas [86] [Keitel et al., unpubliziert]. Eine hohe TGR5 Expression war in der Studie von Zhao und Co-Autoren mit einem signifikant verkürztem Überleben beim Pankreaskarzinom assoziiert [86].

Ähnliche Befunde wurden auch für das Adenokarzinom des Ösophagus erhoben. Hier fand sich eine hohe Expression sowie Hinweise auf mögliche proliferative Wirkung beider Rezeptoren [87-90].

5.4 Ausblick

Trotz aller Erkenntnisse über das Entstehen und die Progression des Cholangiokarzinoms in der Vergangenheit, ist das Verstehen über die Ätiologie und letztlich der Therapie weiterhin unzureichend [11]. Gleichzeitig nimmt der Fokus auf das Cholangiokarzinom mit der weltweit steigenden Inzidenz zu [14].

Die weitgehende Chemoresistenz des Cholangiokarzinoms ist nicht vollständig verstanden [2]. Es gibt Hinweise auf eine Expression von multi-drug-resistenten Genen sowie von hoch-regulierten antiapoptotischen Proteinen, die jeweils einen Teil zum geringen Ansprechen des Cholangiokarzinoms auf eine Chemotherapie beitragen [2].

Auch um die Barriere der Chemoresistenz zu überwinden, wurden zielgerichtete medikamentöse Therapien entwickelt und Fortschritte im genetischen Profiling sollen auch das Überleben von Patienten mit einem Cholangiokarzinom verbessern [21]. Während zielgerichtete Therapien gegen FGFR2 bzw. IDH1 [18] einen deutlichen Überlebensvorteil in der Zweitlinientherapie erreichen können, stehen diese Therapien nur einem kleinen Anteil der Patienten zur Verfügung [24]. Darüber hinaus stellt die fortschreitende Cholestase und damit einhergehende Hyperbilirubinämie eine Kontraindikation für klassische

Chemotherapien dar. Daher werden weitere zielgerichtete Therapiestrategien dringend benötigt.

Eine zielgerichtete Therapie gegen den S1PR2- oder auch den TGR5 Rezeptor wäre nicht nur im Kontext des Cholangiokarzinoms zu sehen, sondern hätte auf Grund des jeweils pleiotropen Spektrums der Rezeptoren [91] möglicherweise auch einen Nutzen bei weiteren Cholangiopathien wie der Primär sklerosierenden Cholangitis oder der Primär biliären Cholangitis, wo ebenfalls kurative pharmakologische Therapien fehlen [67]. Ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor gilt generell als vielversprechendes Ziel, da ca. 30% aller modernen Medikamente auf einen solchen ausgerichtet sind [56]. Darüber hinaus könnten derartige Therapieansätze wie oben ausgeführt auch bei weiteren gastrointestinalen Tumoren zum Einsatz kommen.

Andererseits wird die systemische Inhibition vom S1PR2- und TGR5 Rezeptor möglicherweise multiple Nebenwirkungen haben, wie im Falle des TGR5 Rezeptors bspw. in der Gallenblasen-Entleerung mit Folgen wie z.B. einem Gallenblasenhydrops oder Gallensteinen, Hyperinflammation, portale Hypertension, Erhöhung der Herzfrequenz, Juckreiz oder der Steigerung des Gefäßwiderstandes [62].

Auf Grund zahlreicher Interaktionen von Signalwegen in der Karzinogenese des Cholangiokarzinoms entsteht eine zunehmende Relevanz einer Kombinationstherapie [21]. An dieser Stelle kann eine mögliche redundante Expression vom S1PR2 und TGR5 Rezeptor von Bedeutung sein, da falls eine Therapie ausgerichtet auf einen der Rezeptoren erfolgen soll, diese gegen beide Rezeptoren gleichzeitig gerichtet sein sollte. Anderenfalls würde der jeweils andere Rezeptor die therapeutische Wirkung auf Grund einer möglichen redundanten Expression einschränken. In dieser Arbeit wurde erstmals belegt, dass ein Knockout von TGR5 sowohl in murinen Cholangiozyten, als auch in der CCC Zelllinie TFK zu einer signifikanten Überexpression von S1PR2 führt (Kap. 4.2.2). Ebenfalls deutet die Steigerung der TGR5 mRNA Expression in einzelnen CCC Zelllinien unter Inhibition des S1PR2 Rezeptors mit JTE013 eine Kompensation im Sinne einer Redundanz an (Abb. 33).

Insgesamt werden durch die geringen Fallzahlen gegenüber anderen soliden Tumoren, nationale und internationale Multicenter-Studien notwendig sein [9], um eine Aussagekraft über die jeweilige personalisierte Therapie treffen zu können [6].

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle von Gallensalzrezeptoren bei Cholangiokarzinomen.

Das Cholangiokarzinom stellt eine meist tödliche, maligne Krankheit mit nur begrenzten Therapieoptionen der intra- und extrahepatischen Gallengänge dar. Risikofaktoren stellen Erkrankungen, die zu einer chronischen Inflammation sowie einer Cholestase mit Erhöhung der Serumgallensäuren führen, dar. Somit wird seit längerem eine Bedeutung von Gallensalzrezeptoren für die Pathogenese des Cholangiokarzinoms angenommen. Allerdings wurden in bisherigen Arbeiten die verschiedenen Gallensalzrezeptoren einzeln betrachtet. Ziel der aktuellen Arbeit war es, die Bedeutung der G-Protein gekoppelten Gallensäurerezeptoren S1PR2 und TGR5 für das Cholangiokarzinom zu untersuchen.

Hierzu wurden Real-Time-PCR, Western Blot, und Immunfluoreszenzfärbungen von Cholangiokarzinomzelllinien, murinen Cholangiozyten, murinem Gewebe sowie humanem Cholangiokarzinomgewebe und den jeweiligen Kontrollgeweben durchgeführt. Eine Detektion von S1PR2 auf Proteinebene war durch Charakterisierung von zwei neuen anti-S1PR2 Antiseren möglich. Zur funktionellen Charakterisierung wurde der S1PR2- und TGR5-abhängige ERK-Signalweg untersucht.

S1PR2 konnte ähnlich wie TGR5 in murinen und humanen Cholangiozyten sowie humanen Cholangiokarzinomzelllinien auf mRNA sowie Proteinebene nachgewiesen werden. Immunfluoreszenzfärbungen mit den anti-S1PR2 Antiseren ergaben ein überwiegend intrazelluläres Muster. Ein großer Teil des Rezeptors konnte im endoplasmatischen Retikulum sowie in weiteren intrazellulären vesikulären Strukturen nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu TGR5 fanden sich in den verschiedenen CCC Zelllinien unterschiedliche Expressionstärken für S1PR2. Eine Stimulation mit Taurocholsäure als endogenem Liganden für sowohl TGR5, als auch S1PR2 sowie einen S1PR2 spezifischen Inhibitor ergaben eine zelltyp-spezifische Regulation von S1PR2.

Im humanen CCC Gewebe waren beide Rezeptoren im Vergleich zum nicht-tumorösen Randgewebe überexprimiert. Entsprechend könnten Gallensäuren über beide Rezeptoren zur Progression des CCC beitragen.

In TGR5-defizienten murinen Cholangiozyten sowie einer TGR5-defizienten CCC Zelllinie fand sich eine Hochregulation der S1PR2 Expression, was auf eine essentielle, redundante Funktion beider Rezeptoren sowohl unter physiologischen, als auch malignen Bedingungen, schließen lässt. Weitere Arbeiten an TGR5 sowie S1PR2 doppeldefizienten Zelllinien und Tieren werden diese Frage beantworten können.

7 **Summary**

The aim of this work was to investigate the role of bile salt receptors in cholangiocarcinoma.

Cholangiocarcinoma is a mostly fatal, malignant disease originating from the intra- and extrahepatic bile ducts with only limited treatment options. Among the risk factors are diseases leading to chronic inflammation as well as cholestasis with an increase in serum bile acids. It has therefore long been assumed that bile salt receptors are important in the pathogenesis of cholangiocarcinomas. However, previous studies have only looked at the various bile salt receptors individually. The aim of the current study was to investigate the significance of the G-protein-coupled bile acid receptors S1PR2 and TGR5 in cholangiocarcinoma.

Real-time-PCR, Western blot, and immunofluorescence staining of cholangiocarcinoma cell lines, murine cholangiocytes, murine tissue as well as human cholangiocarcinoma tissue and the responding control tissues, were performed. Detection of S1PR2 at the protein level was possible by characterization of two new anti-S1PR2 antisera. For functional characterization, the S1PR2- and TGR5-dependent ERK signaling pathway was investigated.

Similar to TGR5, S1PR2 could be detected in murine and human cholangiocytes as well as in human cholangiocarcinoma cell lines on a mRNA and protein level. Immunofluorescence staining with the anti-S1PR2 antisera revealed a predominantly intracellular pattern. A large part of the receptor could be detected in the endoplasmic reticulum as well as in other intracellular vesicular structures.

Compared to TGR5, various expression levels for S1PR2 were found in different CCC cell lines. Stimulation with taurocholic acid as an endogenous ligand for both receptors and an S1PR2-specific inhibitor resulted in a cell type-specific regulation of S1PR2.

In human CCC tissue, both receptors were overexpressed compared to the non-tumorous marginal tissue. Accordingly, bile acids stimulate both receptors and therefore may contribute to CCC progression. Understanding this mechanism may allow for therapeutic interventions in the future.

In TGR5-deficient murine cholangiocytes and in a TGR5-deficient CCC cell line, the S1PR2 expression was found to be upregulated, suggesting an essential, redundant function of both receptors in normal as well as in malignant cholangiocytes. Further work on TGR5 as well as S1PR2 double-deficient cell lines and in animals will answer whether both receptors are essential for cholangiocyte physiology and/or cholangiocarcinoma pathogenesis.

8 Literaturverzeichnis

1. Liu, R., et al., *Conjugated bile acids promote cholangiocarcinoma cell invasive growth through activation of sphingosine 1-phosphate receptor 2*. Hepatology, 2014. **60**(3): p. 908-918.
2. Blechacz, B. and G.J. Gores, *Cholangiocarcinoma: Advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 308-321.
3. Khan, S.A., et al., *Cholangiocarcinoma*. Lancet, 2005. **366**(9493): p. 1303-14.
4. Maroni, L., G. Alpini, and M. Marzioni, *Cholangiocarcinoma development: The resurgence of bile acids*. 2014. **60**(3): p. 795-797.
5. Nakagawa, H., et al., *Peribiliary Glands as the Cellular Origin of Biliary Tract Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(6).
6. Sirica, A.E., et al., *Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Continuing Challenges and Translational Advances*. Hepatology, 2019. **69**(4): p. 1803-1815.
7. Sirica, A.E., *Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy*. Hepatology, 2005. **41**(1): p. 5-15.
8. Ustundag, Y. and Y. Bayraktar, *Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(42): p. 6458-66.
9. Hezel, A.F., V. Deshpande, and A.X. Zhu, *Genetics of biliary tract cancers and emerging targeted therapies*. J Clin Oncol, 2010. **28**(21): p. 3531-40.
10. Al-Bahrani, R., et al., *Cholangiocarcinoma: risk factors, environmental influences and oncogenesis*. Ann Clin Lab Sci, 2013. **43**(2): p. 195-210.
11. Liu, R., et al., *Taurocholate Induces Cyclooxygenase-2 Expression via the Sphingosine 1-phosphate Receptor 2 in a Human Cholangiocarcinoma Cell Line*. J Biol Chem, 2015. **290**(52): p. 30988-1002.
12. Banales, J.M., et al., *Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020. **17**(9): p. 557-588.
13. Izquierdo-Sanchez, L., et al., *Cholangiocarcinoma landscape in Europe: Diagnostic, prognostic and therapeutic insights from the ENSCCA Registry*. J Hepatol, 2022. **76**(5): p. 1109-1121.
14. Forner, A., et al., *Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma*. Liver Int, 2019.
15. Erice, O., et al., *Differential effects of FXR or TGR5 activation in cholangiocarcinoma progression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2018. **1864**(4, Part B): p. 1335-1344.
16. Mancini, S., et al., *Trends in Liver Cancer Incidence and Survival in Italy by Histologic Type, 2003–2017*. Cancers, 2022. **14**(24): p. 6162.
17. Gilliaux, Q., et al., *Incidence and Prognosis of Biliary Tract and Gallbladder Cancers in a Belgian Academic Hospital*. J Gastrointest Cancer, 2021. **52**(3): p. 1003-1009.
18. Kendre, G., et al., *Charting co-mutation patterns associated with actionable drivers in intrahepatic cholangiocarcinoma*. J Hepatol, 2023. **78**(3): p. 614-626.
19. Chen, M.H., et al., *Identification of SPHK1 as a therapeutic target and marker of poor prognosis in cholangiocarcinoma*. Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23594-608.
20. Harding, J.J., et al., *Rational development of combination therapies for biliary tract cancers*. J Hepatol, 2023. **78**(1): p. 217-228.

21. Rizvi, S., et al., *Cholangiocarcinoma — evolving concepts and therapeutic strategies*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2018. **15**(2): p. 95-111.
22. Primrose, J.N., et al., *Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2019. **20**(5): p. 663-673.
23. Voesch, S., et al., [Not Available]. Z Gastroenterol, 2022. **60**(1): p. e131-e185.
24. Vogel, A., et al., *Biliary tract cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2023. **34**(2): p. 127-140.
25. Bergquist, A., et al., *Impact on follow-up strategies in patients with primary sclerosing cholangitis*. Liver Int, 2023. **43**(1): p. 127-138.
26. *EASL Clinical Practice Guidelines on sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2022. **77**(3): p. 761-806.
27. Valle, J., et al., *Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer*. New England Journal of Medicine, 2010. **362**(14): p. 1273-1281.
28. Oh, D.Y., et al., *Gemcitabine and cisplatin plus durvalumab with or without tremelimumab in chemotherapy-naïve patients with advanced biliary tract cancer: an open-label, single-centre, phase 2 study*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022. **7**(6): p. 522-532.
29. Abou-Alfa, G.K., et al., *Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study*. Lancet Oncol, 2020. **21**(5): p. 671-684.
30. Abou-Alfa, G.K., et al., *Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2020. **21**(6): p. 796-807.
31. Zhou, H. and P.B. Hylemon, *Bile acids are nutrient signaling hormones*. Steroids, 2014. **86**: p. 62-8.
32. Sinal, C.J., et al., *Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis*. Cell, 2000. **102**(6): p. 731-44.
33. Baiocchi, L., et al., *Dual Role of Bile Acids on the Biliary Epithelium: Friend or Foe?* Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).
34. Seubwai, W., et al., *Overexpression of vitamin D receptor indicates a good prognosis for cholangiocarcinoma*. Cancer, 2007. **109**(12): p. 2497-2505.
35. Makishima, M., et al., *Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-1365.
36. Parks, D.J., et al., *Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1365-1368.
37. Wang, H., et al., *Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR/BAR*. Molecular Cell, 1999. **3**(5): p. 543-553.
38. Keitel, V., J. Stindt, and D. Häussinger, *Bile Acid-Activated Receptors: GPBAR1 (TGR5) and Other G Protein-Coupled Receptors*. Handb Exp Pharmacol, 2019. **256**: p. 19-49.
39. Masyuk, A.I., et al., *Ciliary subcellular localization of TGR5 determines the cholangiocyte functional response to bile acid signaling*. 2013. **304**(11): p. G1013-G1024.
40. Li, T. and J.Y. Chiang, *Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(4): p. 948-83.

41. Keitel, V. and D. Haussinger, *Role of TGR5 (GPBAR1) in Liver Disease*. Semin Liver Dis, 2018. **38**(4): p. 333-339.
42. Dai, J., et al., *Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 41.
43. Pols, T.W.H., et al., *The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation*. Journal of Hepatology, 2011. **54**(6): p. 1263-1272.
44. Wan, Y.Y. and L. Sheng, *Regulation of bile acid receptor activity(☆)*. Liver Res, 2018. **2**(4): p. 180-185.
45. Keitel, V. and D. Haussinger, *TGR5 in cholangiocytes*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(3): p. 299-304.
46. Wang, Y., et al., *The role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in bile-acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice*. Hepatology, 2017. **65**(6): p. 2005-2018.
47. de Aguiar Vallim, T.Q., E.J. Tarling, and P.A. Edwards, *Pleiotropic roles of bile acids in metabolism*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 657-69.
48. Maruyama, T., et al., *Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **298**(5): p. 714-719.
49. Kawamata, Y., et al., *A G protein-coupled receptor responsive to bile acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9435-40.
50. Adada, M., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor 2*. The FEBS Journal, 2013. **280**(24): p. 6354-6366.
51. Kihara, Y., et al., *Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(15): p. 3575-94.
52. Nagahashi, M., et al., *The roles of bile acids and sphingosine-1-phosphate signaling in the hepatobiliary diseases*. J Lipid Res, 2016. **57**(9): p. 1636-43.
53. Wang, C., et al., *Systemic distribution, subcellular localization and differential expression of sphingosine-1-phosphate receptors in benign and malignant human tissues*. Experimental and Molecular Pathology, 2014. **97**(2): p. 259-265.
54. Webster, C.R.L. and M.S. Anwer, *Hydrophobic bile acid apoptosis is regulated by sphingosine-1-phosphate receptor 2 in rat hepatocytes and human hepatocellular carcinoma cells*. 2016. **310**(10): p. G865-G873.
55. Serriere-Lanneau, V., et al., *The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 triggers hepatic wound healing*. Faseb j, 2007. **21**(9): p. 2005-13.
56. Watters, R.J., et al., *Targeting sphingosine-1-phosphate receptors in cancer*. Anticancer Agents Med Chem, 2011. **11**(9): p. 810-7.
57. Studer, E., et al., *Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes*. Hepatology, 2012. **55**(1): p. 267-76.
58. Leong, W.I. and J.D. Saba, *S1P metabolism in cancer and other pathological conditions*. Biochimie, 2010. **92**(6): p. 716-23.
59. Kwong, E., et al., *Bile acids and sphingosine-1-phosphate receptor 2 in hepatic lipid metabolism*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(2): p. 151-7.
60. Kwong, E.K., et al., *Sphingosine Kinases/Sphingosine 1-Phosphate Signaling in Hepatic Lipid Metabolism*. Curr Pharmacol Rep, 2017. **3**: p. 176-183.
61. Jones, H., G. Alpini, and H. Francis, *Bile acid signaling and biliary functions*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(2): p. 123-8.

62. Deutschmann, K., et al., *Bile acid receptors in the biliary tree: TGR5 in physiology and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2018. **1864**(4, Part B): p. 1319-1325.
63. Duboc, H., Y. Taché, and A.F. Hofmann, *The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application*. Digestive and Liver Disease, 2014. **46**(4): p. 302-312.
64. Keitel, V. and D. Häussinger, *Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease*. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2012. **36**(5): p. 412-419.
65. Keitel, V. and D. Haussinger, *TGR5 in the biliary tree*. Dig Dis, 2011. **29**(1): p. 45-7.
66. Reich, M., et al., *TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro*. Gut, 2016. **65**(3): p. 487.
67. Keitel, V., M. Reich, and D. Haussinger, *TGR5: pathogenetic role and/or therapeutic target in fibrosing cholangitis?* Clin Rev Allergy Immunol, 2015. **48**(2-3): p. 218-25.
68. Kremer, A.E., et al., *Pathogenesis and Management of Pruritus in PBC and PSC*. Digestive Diseases, 2015. **33**(2): p. 164-175.
69. Reich, M., et al., *Role of the G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 in Liver Damage*. Dig Dis, 2017. **35**(3): p. 235-240.
70. Fang, Y., et al., *Conjugated bile acids regulate hepatocyte glycogen synthase activity in vitro and in vivo via Galphai signaling*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(4): p. 1122-8.
71. Haussinger, D. and V. Keitel, *Dual role of the bile acid receptor Takeda G-protein-coupled receptor 5 for hepatic lipid metabolism in feast and famine*. Hepatology, 2017. **65**(3): p. 767-770.
72. Xia, X., et al., *Bile acid interactions with cholangiocytes*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(22): p. 3553-63.
73. Chiang, K.-C., et al., *Chemopreventive and chemotherapeutic effects of dietary supplementation of vitamin D on cholangiocarcinoma in a Chemical-Induced animal model*. Oncotarget, 2014. **5**(11): p. 3849-3861.
74. Saijyo, S., et al., *Establishment of a New Extrahepatic Bile Duct Carcinoma Cell Line, TFK-1*. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 1995. **177**(1): p. 61-71.
75. Sirisinha, S., et al., *Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line from a Thai patient with intrahepatic bile duct cancer*. Asian Pac J Allergy Immunol, 1991. **9**(2): p. 153-7.
76. Miyagiwa, M., et al., *A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium*. In Vitro Cell Dev Biol, 1989. **25**(6): p. 503-10.
77. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
78. Chiang, J.Y.L., *Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy*. Liver Research, 2017. **1**(1): p. 3-9.
79. Keitel, V., et al., *Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells*. 2008. **372**(1): p. 78-84.
80. Longo, P.A., et al., *Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)*. Methods Enzymol, 2013. **529**: p. 227-40.

81. Nagahashi, M., et al., *Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression*. Hepatology, 2015. **61**(4): p. 1216-26.
82. Li, T., et al., *Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 996-1006.
83. Ikeda, H., et al., *Sphingosine 1-phosphate enhances portal pressure in isolated perfused liver via S1P2 with Rho activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(3): p. 754-9.
84. Charbel, A., et al., *Spatiotemporal analysis of tumour-infiltrating immune cells in biliary carcinogenesis*. Br J Cancer, 2022. **127**(9): p. 1603-1614.
85. Sarkar, J., et al., *Conjugated Bile Acids Accelerate Progression of Pancreatic Cancer Metastasis via S1PR2 Signaling in Cholestasis*. Ann Surg Oncol, 2023. **30**(3): p. 1630-1641.
86. Zhao, R.Y., et al., *High expression of TGR5 predicts a poor prognosis in patients with pancreatic cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2018. **11**(7): p. 3567-3574.
87. Liu, R., et al., *Conjugated Bile Acids Promote Invasive Growth of Esophageal Adenocarcinoma Cells and Cancer Stem Cell Expansion via Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2-Mediated Yes-Associated Protein Activation*. Am J Pathol, 2018. **188**(9): p. 2042-2058.
88. Marketkar, S., et al., *TGR5 expression in benign, preneoplastic and neoplastic lesions of Barrett's esophagus: Case series and findings*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(8): p. 1338-1344.
89. Pang, C., et al., *Bile salt receptor TGR5 is highly expressed in esophageal adenocarcinoma and precancerous lesions with significantly worse overall survival and gender differences*. Clin Exp Gastroenterol, 2017. **10**: p. 29-37.
90. Hong, J., et al., *Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma*. Gut, 2010. **59**(2): p. 170-80.
91. Rodrigues, C.M. and H. Moshage, *Targeting TGR5 in cholangiocyte proliferation: default topic*. Gut, 2016. **65**(3): p. 369-70.

9 Abkürzungsverzeichnis

ASBT	Apikaler natriumabhängiger Gallensäuretransporter
BSA	<i>a bovine serum albumin</i>
CCC	Cholangiokarzinom
CK	Cytokeratin
DHC	Ductus hepaticus communis
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC	Endoskopisch retrograde Cholangiographie
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HM	Hungermedium
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IDH	Isocitratdehydrogenase
JTE	<i>1-[1,3-Dimethyl-4-(2-methylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-6-yl]-4-(3,5dichloro-4-pyridinyl)-semicarbazide</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
PAA	Polyacrylamid

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i>
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PR2	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 2
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Spp.	Species
TCA	Taurocholsäure
TGR5	Takeda-G-Protein-Rezeptor-5
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
WT	Wildtyp

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakterisierung der neuen anti- S1PR2 -Antikörper in HEK293 Zellen	23
Abbildung 2: Charakterisierung des S1PR2-1 -AK in Cholangiokarzinomzellen	24
Abbildung 3: Charakterisierung des S1PR2-2 -AK in Cholangiokarzinomzellen nach Rezeptorstimulation bzw. -hemmung	25
Abbildung 4: Untersuchung zur mRNA Expression von S1PR2 und TGR5 in verschiedenen Cholangiokarzinomzelllinien.....	27
Abbildung 5: Untersuchung zur S1PR2 mRNA Expression in TGR5-defizienten Zellen in Relation zu SDHA (A, C) und HPRT (B, D).....	28
Abbildung 6: Western Blot 1: S1PR2 Proteinmenge in TGR5-defizienten TFK-Zellen.....	29
Abbildung 7: Western Blot 2: S1PR2 Proteinmenge in TGR5-defizienten murinen Cholangiozyten (MNC).....	29
Abbildung 8: Western Blot 4: S1PR2 Proteinmenge in Cholangiokarzinomzelllinien.....	30
Abbildung 9: Western Blot 5: S1PR2 Proteinmenge in den CCC Zelllinien HuCCA1 und HuCCT1	30
Abbildung 10: Lokalisation von S1PR2 mittels Immunfluoreszenzfärbung in HuCCT1 Zellen.	31
Abbildung 11: Lokalisation von S1PR2 mittels Immunfluoreszenzfärbung in HuCCA1 Zellen.....	32
Abbildung 12: Lokalisation von S1PR2 mittels Immunfluoreszenzfärbung TFK Zellen.	33
Abbildung 13: Lokalisation von S1PR2 in murinem Lebergewebe	25
Abbildung 14: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK von EGI und H-69 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 µmol, 30 min), JTE (10µmol, 30 min) bzw. TCA+ JTE.....	26
Abbildung 15: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK von EGI und H-69 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 µmol, 30 min), JTE (10µmol, 30 min) bzw. TCA+ JTE	36
Abbildung 16: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in TFK, H-69 und EGI unter Kontrollbedingungen (K) bzw. nach Stimulation mit TCA (100 µmol, 30 min), JTE (10µmol, 30 min) bzw. TCA+ JTE.	37
Abbildung 17: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in TFK, H-69 und EGI unter Kontrollbedingungen (K) bzw. nach Stimulation mit TCA (100 µmol, 30 min), JTE (10µmol, 30 min) bzw. TCA+ JTE.	37

Abbildung 18: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in HuCCA1 und HuCCT1 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 µmol, 30 min), JTE (10µmol, 30 min) bzw. TCA+ JTE.....	38
Abbildung 19: Western Blot auf Phospho-ERK bzw. Gesamt-ERK in HuCCA1 und HuCCT1 unter Kontrollbedingungen bzw. nach Stimulation mit TCA (100 µmol, 30 min), JTE (10µmol, 30 min) bzw. TCA+ JTE.....	38
Abbildung 20: S1PR2 mRNA in Cholangiokarzinomzelllinien unter Stimulation, Inhibition und deren Kombination.....	39
Abbildung 21: TGR5 mRNA in Cholangiokarzinomzelllinien unter Stimulation, Inhibition und deren Kombination.....	40
Abbildung 22: S1PR2 Proteinmenge von Cholangiokarzinom Patienten vs. Randgewebe als Kontrolle des jeweils selben Patienten. Gapdh diene als Beladungskontrolle.....	42
Abbildung 23: S1PR2 Proteinmenge von Cholangiokarzinom Patienten vs. Randgewebe als Kontrolle des jeweils selben Patienten. Gapdh diene als Beladungskontrolle.....	42
Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von humaner Leber mit Antikörpern gegen S1PR2 und CK-19.....	43
Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbungen von jeweils CCC und Kontrollgewebe dreier Patienten mit Antikörpern gegen S1PR2 und CK-19	45
Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbungen von jeweils CCC und Kontrollgewebe dreier Patienten mit Antikörpern gegen TGR5 und CK-19.	46
Abbildung 27: Detektion von S1PR2 und TGR5 mRNA Expression in humanen Cholangiokarzinomgewebe (CCC) bzw. nicht-tumorösen Randgewebe (NO).	48

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunzytochemie	6
Tabelle 2 : Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Proteinanalytik	11

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Verena Keitel-Anselmino bedanken, die letztlich auch aus der Ferne mein erstes Bauchgefühl bestätigte, dass ich mit Ihr zuverlässig und respektvoll zusammenarbeiten kann.

Dr. Maria Reich für die engagierte sowie enge Betreuung und die grenzenlose Unterstützung.

Dr. Kathleen Deutschmann, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Der gesamten AG Keitel für die Freundschaft, die familiäre Atmosphäre im Labor und die wissenschaftliche Expertise.

Der AG Bode in der Laborgemeinschaft für die gemeinsame Zeit, die Hilfestellung sowie die aufbauenden Worte.

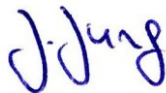
Meinem ehemaligen Leistungskurslehrer in Chemie, Dr. Rudolf Hösen, der mir das Selbstbewusstsein gab, in einem Labor arbeiten zu können.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Schwester Vivian, meinen Eltern und auch meinen Großeltern für Alles danken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Richtlinien der Medizinischen Fakultät zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis erstellt worden ist. 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 geahndet werden.

Mönchengladbach, 28. September 2024



Justin Jung