

**Regulation humaner konjugierter und nicht-konjugierter
Gallensäuren nach einer oralen Lipidbelastung -
Eine LC-MS/MS-basierte massenspektrometrische Analyse**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin (FB 11)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hannah Sophie Belikan (geb. Neumann)
aus Mannheim

Gießen 2020

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III,
unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Schäffler,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler
2. Gutachter: Prof. Dr. Günter Lochnit

Tag der Disputation: 14.12.2020

Vorbemerkung:

Wichtige Teile dieser Arbeit konnten mit mir als Co-Autorin in der Zeitschrift „PLOS ONE“ publiziert werden:

Andreas Schmid, Hannah Neumann, Thomas Karrasch, Gerhard Liebisch, Andreas Schäffler: Bile acid metabolome after an oral lipid tolerance test by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS). PLOS ONE Feb.10; 11 (2), 2016, 1-13

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Übersicht über die physiologische und metabolische Rolle von Gallensäuren</i>	1
1.2	<i>Synthese, Funktion und Regulation von Gallensäuren</i>	3
1.2.1	Aufbau und Synthese	4
1.2.2	Funktion und Regulation	6
1.3	<i>Das Fettgewebe als endokrines und immunologisches Organ.....</i>	10
1.3.1	Zusammensetzung und Funktion.....	10
1.3.2	Inflammation des Fettgewebes	13
1.3.3	Adipokine.....	17
1.3.4	Chemokine	19
1.3.5	Rezeptoren	19
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	21
2	Material und Methoden.....	23
2.1	<i>Material und Geräte</i>	23
2.1.1	Geräte.....	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3	Chemikalien und Enzyme.....	25
2.1.4	Kit-Systeme.....	26
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	26
2.1.6	Murine Zellkultur der Zelllinie 3T3-L1	27
2.1.7	Primer	27
2.2	<i>Methoden</i>	28
2.2.1	Studienkohorte	28
2.2.2	Oraler Lipid Toleranztest (OLTT)	28
2.2.3	Gallensäurenquantifizierung HPLC-MS/MS	30
2.2.4	Differenzierung muriner 3T3-L1 Adipozyten.....	32
2.2.5	RNA-Isolierung	33
2.2.6	Quantitative Real-Time-PCR.....	35
2.2.7	Glycerol Assay	37
2.2.8	Statistische Analyse	37
3	Ergebnisse.....	38
3.2	<i>In vivo.....</i>	38
3.2.1	Demographische und klinische Daten	38
3.2.2	Gallensäurenprofile während des OLTT	39
3.2.3	Korrelationen von FGF-19 und FGF-21	45
3.2.4	Einfluss von Geschlecht, BMI und hormoneller Kontrazeption	50
3.3	<i>In vitro.....</i>	54
3.3.1	Effekte auf die basale Lipolyse.....	55
3.3.2	Effekte auf die Genexpression von CCL2	57
3.3.3	Effekte auf die Genexpression von Leptin	58
3.3.4	Effekte auf die Genexpression von PPAR γ	59
4	Diskussion.....	60
4.1	<i>Allgemeine Diskussion</i>	60

<i>4.2 Spezielle Diskussion</i>	62
5 Zusammenfassung	70
6 Abkürzungsverzeichnis	72
7 Darstellungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis	75
8 Literaturverzeichnis/ Quellenangaben	77
9 Publikationsverzeichnis und Kongressbeiträge	95
10 Ehrenwörtliche Erklärung	96
11 Danksagung	97
12 Tabellarischer Lebenslauf	99
13 Anhang	102

1. Einleitung

1.1 Übersicht über die physiologische und metabolische Rolle von Gallensäuren

Gallensäuren spielen in der Verdauung von Fetten eine unerlässliche Rolle. Durch das Herabsetzen der Oberflächenspannung des Wassers kann die Emulgation wasserunlöslicher Bestandteile im Darm ermöglicht werden, insbesondere die Emulgation von Lipiden.^{1,2} Die Angreifbarkeit für Enzyme wird vergrößert.

Neben dieser allseits bekannten Rolle in der intestinalen Resorption von Lipiden und dem gut erforschten Mechanismus der ilealen Resorption und enterohepatischen Rezirkulation in der Leber, findet man inzwischen immer mehr Daten über die vielfältigen systemischen Wirkungen von Gallensäuren. So konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass Gallensäuren auf verschiedene Weise den Kohlenhydrat-Stoffwechsel und Lipid-Stoffwechsel, aber auch die Immunregulation, Wachstum und Differenzierung beeinflussen.³⁻⁵

Basierend auf diesen Beobachtungen kann man nun vermuten, dass Gallensäuren, die nach der Nahrungsaufnahme nicht nur im portal-venösen Blut sondern auch im peripheren Blut zirkulieren, als endokrine und metabolische Signalmoleküle wirken könnten.

Gallensäuren können über zwei Wege wirken: zum einen genomisch über den small heterodimeric partner (SHP)- abhängigen Kernrezeptor farnesoid X receptor α (FXR α) und zum anderen nicht genomisch über den SHP-unabhängigen Gallensäure-Rezeptor (TGR5).^{6,7} So lässt sich die Wirkweise der Gallensäuren gut mit der eines Hormons vergleichen.

Die Stoffwechselfunktion und postprandiale Regulation der systemischen Gallensäuren könnte von essentieller Bedeutung sein, wurde bisher allerdings nur unzureichend erforscht.

Die Erkennung neuer Angriffspunkte im Stoffwechsel ist von großer Bedeutung. In der heutigen Gesellschaft stellt Übergewicht, welches durch eine positive Energiebilanz über einen längeren Zeitraum entsteht, ein immer größer werdendes gesundheitliches, aber auch wirtschaftliches und soziales Problem dar. Bereits Kinder und Jugendliche sind betroffen.

Per Definition besteht Übergewicht ab einem body mass index (BMI) über 25 kg/m². Der BMI berechnet sich aus der Formel $BMI = [\text{Körpergewicht (kg)}] / [\text{Körpergröße (m)}^2]$. Von

Adipositas, welches wiederum in drei Schweregrade eingeteilt wird spricht man ab einem BMI von 30 kg/m². Die Prävalenz von Adipositas liegt in Deutschland bei etwa 23%.⁸ Einige Volkserkrankungen wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Arthrose werden durch Übergewicht begünstigt; auch das kardiovaskuläre Risiko steigt insbesondere mit abdomineller Adipositas. Doch auch für der Entstehung von Krebserkrankungen oder Erkrankungen des Zentralnervensystems spielt Adipositas eine Rolle.^{9,10}

Die wichtigsten Gallensäuren-Pfade über FXR wurden bisher in Tiermodellen beschrieben und beinhalten molekulare und pathogenetische Auswirkungen auf Leberfibrose¹¹, Entzündung¹², Atherosklerose, Fettstoffwechsel¹³, Kohlenhydratstoffwechsel¹⁴, Endothelfunktion¹⁵, Schilddrüsenfunktion¹⁶ und Gallensäure-Homöostase¹⁷.

Die Gallensäuren fungieren als Liganden für FXR α , der in der Leber, Nebenniere, Niere und dem Darm lokalisiert ist.¹⁸ Durch die FXR α -aktivierte Gentranskription können verschiedene Stoffwechselwege wie die Gallensäuresynthese, Insulinempfindlichkeit, Glykolyse, Glukoneogenese, Lipogenese und den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel über SHP- und sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)-abhängige Mechanismen beeinflusst und kontrolliert werden.¹⁹⁻²²

FXR hat eine hohe Affinität für mehrere wichtige endogene Gallensäuren, insbesondere Cholsäure, Desoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure und Lithocholsäure, wobei CDCA FXR am Stärksten aktiviert, gefolgt von DCA.²³ Auch einige nicht mit den Gallensäuren verwandte chemische Verbindungen, können als FXR-Liganden agieren. Als Beispiele sind Androsteron und die exogenen Naturstoffpflanzensterole Guggulsteron, Stigmasterol und Forskolin zu nennen.²⁴ Darüber hinaus wurde eine Reihe synthetischer Gallensäurederivate als FXR-Liganden entwickelt, wie 6 α -Ethyl-Chenodesoxycholsäure (6-ECDC) und Gallenalkohole, die sogar eine noch höhere Affinität zu FXR aufweisen als die Gallensäuren selbst.²⁵

Unter anderem werden auch die Fibroblast growth factors (FGFs) FXR α -reguliert. FGFs wirken auf die FGF-Rezeptoren (FGFR1-4) ähnlich wie klassische Hormone. Sie repräsentieren eine Familie von 22 Proteinen. Während die Bedeutung von FGF-19 in der Rolle des Gallensäurestoffwechsels als negativer Regulator der Gallensäuresynthese und des Gallentransports²⁶ weitestgehend bekannt ist, ist die physiologische Rolle des über

peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)-regulierten-FGF-21 in der Stoffwechsellhomöostase bisher noch unklar. ²⁷⁻²⁹

Die gewebespezifischen Stoffwechselaktivitäten von FGF-19 und FGF-21 werden durch Beta-Klotho (ein homologes Single-Pass-Transmembranprotein, an das FGF-Rezeptoren binden) und durch die Expression einer besonderen FGF-Rezeptor-Isoform ³⁰ moduliert. Als FXR α -Aktivatoren sind Gallensäuren in der Lage, die hepatische Expression und Sekretion von FGF-21 zu induzieren. ³¹

FGF-19 gilt als Regulator der Gallensäuresynthese. ^{32,33} Die Transkription des FGF-19-Gens und die Sekretion von FGF-19 durch die Enterozyten des Ileums wird durch die Aktivierung von FXR α bei Gallensäurebindung induziert. FGF-19 zirkuliert über die Pfortader zur Leber und reguliert die hepatische Gallensäure-Synthese durch eine negative Feedbackhemmung ^{22,34} über die fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4)-vermittelte transkriptionelle Repression des Enzyms Cholesterin 7-alpha-Hydroxylase (CYP7A1). CYP7A1 stellt das Schlüsselenzym in der Gallensäuresynthese dar. ³⁵

1.2 Synthese, Funktion und Regulation von Gallensäuren

Gallensäuren sind dazu fähig, die Oberflächenspannung von Wasser deutlich herabzusetzen (Tenside, Emulgatoren). Im Darmtrakt können sie wasserunlösliche Bestandteile emulgieren (insbesondere Lipide) und die Angreifbarkeit für Enzyme vergrößern. ^{1,2} Die Emulgierung wasserunlöslicher Verbindungen ist eine wichtige Voraussetzung für deren Resorption von Fetten und der fettlöslichen Vitamine A, D, E, K. ³⁶ Ferner findet man erhöhte Gallensäure-Konzentrationen bei allen Formen der intra- und extrahepatischen Cholestase. So sind Gallensäuren auch ein früher Indikator einer Leberdysfunktion. ³⁷

Mit Hilfe von ATP-abhängigen Gallensäuretransportern gelangen die Gallensalze aus den Hepatozyten über die Gallenkanäle in den Darm. ³⁸ Über 90% der Gallensalze werden ATP-abhängig im Ileum wieder resorbiert und über die Pfortader erneut den Hepatozyten in der Leber zugeführt. ³⁹ Durch die Erhaltung eines zirkulierenden Pools von Gallensäuren durch den Körper sind diese Transporter an der Homöostase des Gallensäure- sowie Cholesterin-Stoffwechsels beteiligt. ^{40,41}

In den Hepatozyten wird der vektorielle Transport der Gallensäuren vom Blut zu Galle durch Na⁺-Taurocholat-Co-Transport-Peptid (NTCP) und organische Anionentransportpolypeptide (OATPs) sichergestellt. Nach Bindung an ein cytosolisches

Gallensäurebindungsprotein werden die Gallensäuren über eine ATP-abhängige Gallensalz-Ausscheidungspumpe (BSEP) und multiresistente Proteine (MRPs) in den Gallengang abgegeben. Die Gallensäuren werden dann wiederum über Gallengänge in das Darmlumen abgegeben. Die Epithelzellen des Darms nehmen den Hauptbestandteil der sekretierten Gallensäuren über den apikalen natriumabhängigen Gallensäuretransporter (ASBT) und das natriumunabhängige organische Anionentransportpeptid (OATPs) auf. Das zytosolische ileale Gallensäurebindungsprotein (IBABP) vermittelt die transzelluläre Bewegung von Gallensäuren zur basolateralen Membran, über die sie über organische Transporter für gelöste Stoffe (OST) aus den Zellen austreten.³⁸ Der enterohepatische Kreislauf schließt sich letztendlich über die Resynthese von primären Gallensäuren aus sekundären Gallensäuren. Diesen Kreislauf zwischen Leber und Darm durchlaufen die Gallensäuren etwa 3-5mal täglich, sodass täglich nur ca. 0,5g Gallensäuren neu synthetisiert werden müssen.⁴²

1.2.1 Aufbau und Synthese

Gallensäuren sind amphipathische Moleküle mit einem Sterolgrundgerüst.⁴³ Sie werden in der Leber aus Cholesterol synthetisiert und stellen somit auch eine Möglichkeit für den Körper dar, überschüssiges Cholesterin auszuscheiden und zusammen mit Phospholipiden der Entstehung von (Cholesterin-)Gallensteinen entgegenzuwirken.⁴⁴

Zu den primären Gallensäuren (Tab. 1) zählen Cholsäure und Chenodesoxycholsäure. Sie werden mit den Amidien Glycin oder Taurin durch die Aktivierung von CoA konjugiert (= Gallensalze) und sind damit wasserlöslicher als unkonjugierte Gallensäuren. Die Aminosäuren reagieren jeweils unter Bildung einer Säureamidbindung mit der Carboxylgruppe der Cholsäure.⁴³

Ein Teil der Gallensäuren wird im Darmlumen des distalen Ileums bakteriell dehydroxyliert und in die sog. sekundären Gallensäuren Lithocholsäure und Desoxycholsäure umgewandelt.⁶

Ein weiterer kleiner Teil der Chenodesoxycholsäure wird in der Leber zu der tertiären Gallensäure Ursodesoxycholsäure umgewandelt.⁴⁵

Primäre Gallensäuren	Cholsäure, Chenodesoxycholsäure
Sekundäre Gallensäuren - Konjugierte Gallensäuren	Desoxycholsäure, Lithocholsäure Mit Glycin bzw. Taurin
Tertiäre Gallensäuren	Ursodesoxycholsäure, Hyodesoxycholsäure

Tabelle 1: Einteilung der Gallensäuren in primäre, sekundäre und tertiäre Gallensäuren

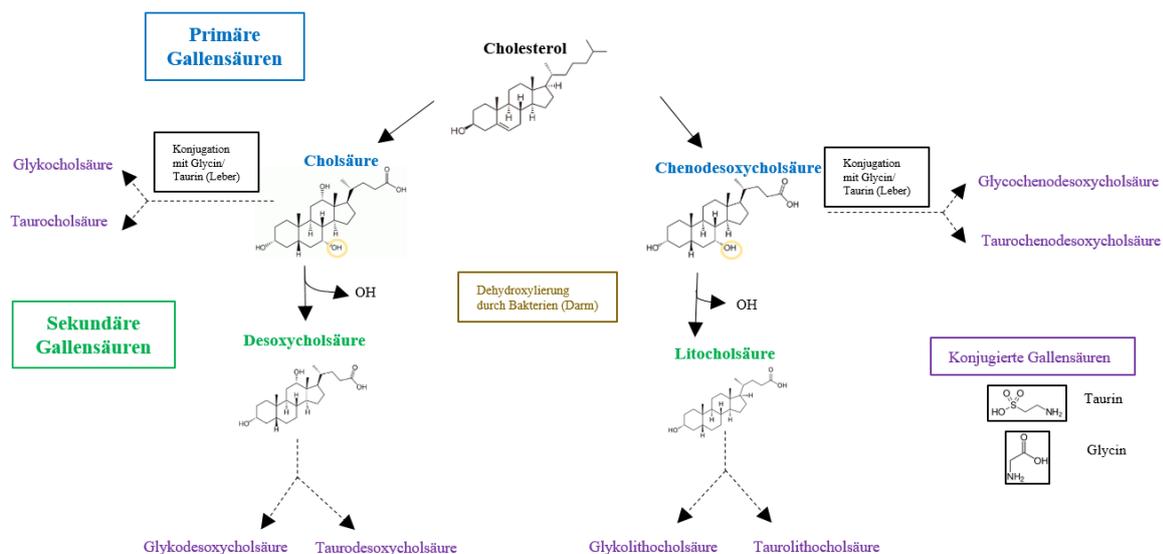


Abbildung 1: Differenzierung von Gallensäuren

In der Synthese spielen die Schlüsselenzyme CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1 und CYP7B1 eine bedeutende Rolle (Tab. 2). CYP7A1 leitet den klassischen Weg ein, der im neutralen Milieu abläuft und die Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure hervorbringt. CYP27A1 leitet im sauren Milieu einen alternativen Weg ein, wobei hauptsächlich CDCA entsteht. Die Seitenkette wird hier zuerst durch CYP27A1 hydroxyliert, dann erfolgt die Konvertierung von 27-Hydroxycholesterol durch CYP8B1 (7a-Hydroxylierung).^{6,46} Die Konjugation mit Glycin und Taurin erfolgt durch die Aminosäure N-Acetyltransferase im Verhältnis 3:1.⁴⁷

Die wesentlichen dafür erforderlichen enzymatischen Syntheseabläufe können in Abbildung 2 schematisch nachvollzogen werden.

CYP7A1 = Cholesterin-7a-Hydroxylase	Synthese in Leber, lokalisiert im ER
CYP27A1 = Cholesterin-27-Hydroxylase	innere Mitochondrienmembran, in vielen Geweben. → Oxidation und Kürzung der Seitenketten (genaue Schritte nicht erwähnt)
CYP8B1 = 12- α -Hydroxylase	12 α -Hydroxylierung

Tabelle 2: Schlüsselenzyme der Gallensäuresynthese

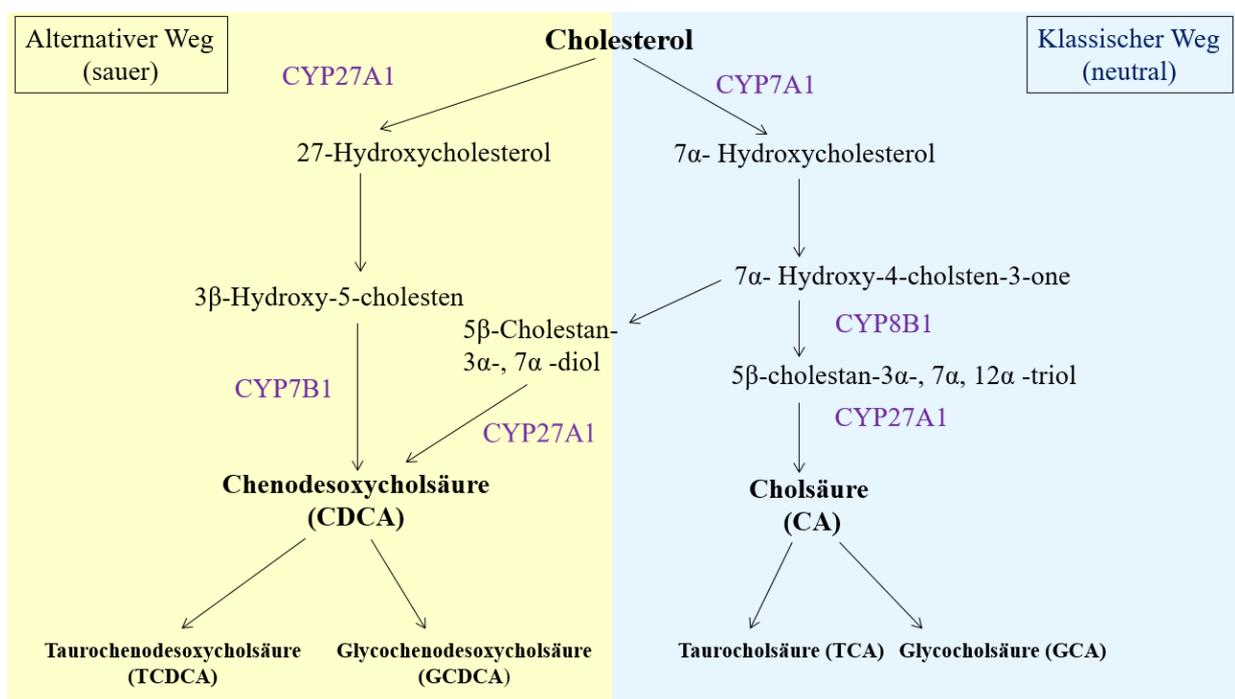


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Gallensäuresynthese im Detail. CYP7A1 leitet den klassischen Weg ein, der im neutralen Milieu abläuft und die Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure hervorbringt. CYP27A1 leitet im sauren Milieu einen alternativen Weg ein, wobei hauptsächlich CDCA entsteht.

1.2.2 Funktion und Regulation

Gallensäuren sind Signalmoleküle mit hormonähnlicher Wirkung und können so eine Vielzahl von Stoffwechselfunktionen beeinflussen (Pleiotropismus). Die Gallensalze können nukleäre Gallensalzrezeptoren wie den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) aktivieren und somit die Expression von Genen bei Bedarf beeinflussen.⁴⁸

Der FXR ist Mitglied der Familie der nuklearen Rezeptor Familie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren: Er besteht aus einer zentralen DNA-Bindedomäne und einem hydrophoben C-Terminus als Liganden-Bindestelle. Bindet eine Gallensäure an den Rezeptor, kommt es zur Dimerisierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors.

49

Die folgende Abbildung (Abbildung 3) zeigt die wichtigsten Angriffspunkte der Gallensäuren in den Stoffwechsel.

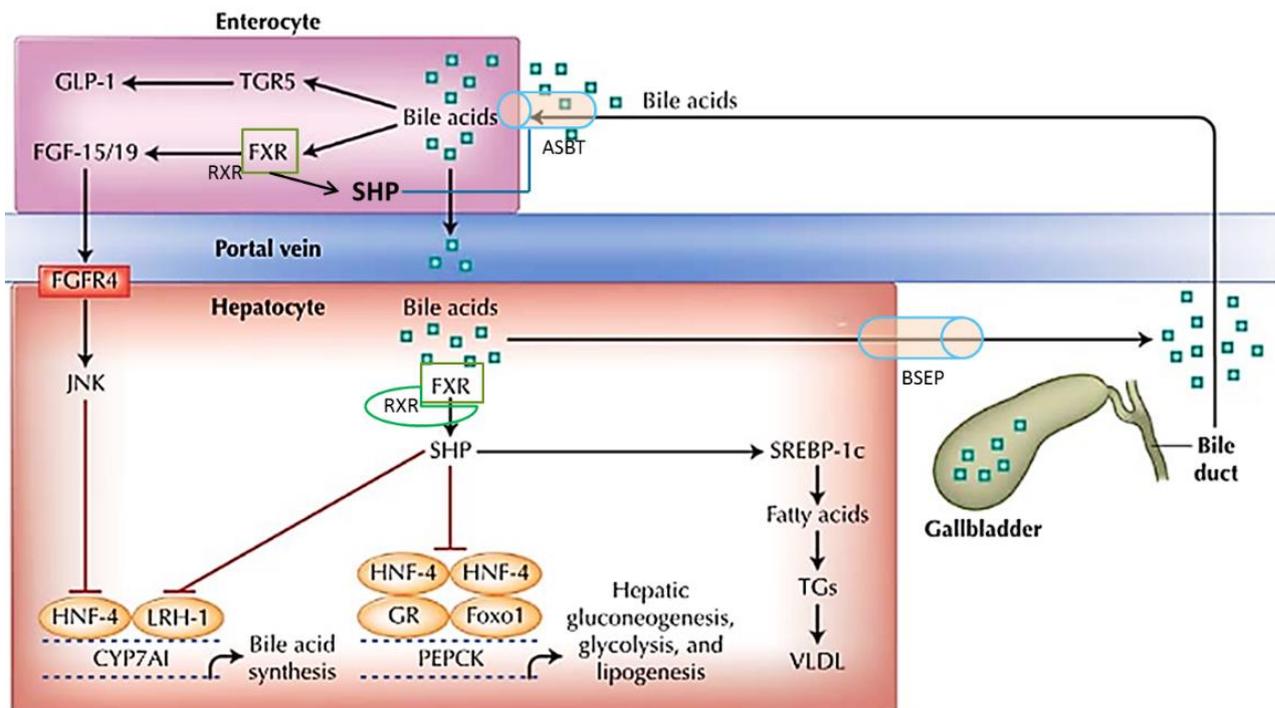


Abbildung 3: Übersicht der Signalkaskaden und Angriffspunkte in den Stoffwechsel, sowie Regulation der Gallensäuren, modifiziert n. ⁵⁰, S.72 mit freundlicher Genehmigung von B.Staels.

ASBT—apical sodium–bile acid transporter

BSEP—bile salt export pump

CYP7A1—cytochrome P450 enzyme cholesterol 7 α -hydroxylase

FGF-15/19—fibroblast growth factor 15/19

FGFR4—fibroblast growth factor receptor 4

Foxo1—Forkhead box protein O1

FXR—farnesoid X receptor

GLP-1—glucagon-like peptide-1

GR—glucocorticoid receptor

HNF-4—hepatocyte nuclear factor-4

JNK—c-jun N-terminal kinase

LRH-1—liver receptor homologue-1

PEPCK—phosphoenolpyruvate carboxykinase

RXR—retinoid X receptor
SHP—small heterodimer partner
SREBP-1c—sterol regulatory element-binding protein-1c
TGR-5—G-protein-coupled bile acid receptor
TGs—triglycerides
VLDL—very low density

Die FXR –aktivierte Gentranskription kontrolliert den Kohlenhydratstoffwechsel, Lipidstoffwechsel, Immunsystem, Wachstum und Differenzierung und Gallensäurestoffwechsel über SHP und SREPP-1c abhängige Mechanismen.

Man unterscheidet die SHP abhängige FXR Aktivierung und den SHP unabhängigen Weg über die Aktivierung des TGR-5 Rezeptor (G-Protein gekoppelt).⁵¹ GLP-1 verstärkt die Glucose-abhängige Freisetzung von Insulin.^{52,53}

Die in der Leber synthetisierten Gallensäuren werden und über BSEP (Bile salt export pump) ausgeschieden. BSEP transportiert sowohl konjugierte als auch unkonjugierte Gallensäuren. Im Ileum werden sie über ASBT (apical sodium dependent bile acid transporter) in den apikalen Enterozyten wieder aufgenommen.⁵⁴ Über eine Aktivierung von FXR wird die FGF19 Expression induziert. FGF19 wird wiederum über die Portalvene zur Leber transportiert und aktiviert dort die Leber-spezifische Rezeptortyrosinkinase FGFR4 (FXR/FGF19/FGFR4) und die JNK—c-jun N- terminal Kinase.⁵⁵

Gleichzeitig erfolgt durch die Aktivierung von FXR die Expression von SHP. SHP unterdrückt die Aktivierung von den verschiedenen Transkriptionsfaktoren liver X receptor, liver receptor homologue-1 (LRH-1) und hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α). Es kommt zu einer Inhibition der LRH-1 induzierte Aktivierung von CYP7A1³⁵, einer durch Gallensäuren induzierte Unterdrückung von HNF-4 α und Hemmung der Transkription von CYP7A1 und Hemmung der Aufnahme von Gallensäuren über ASBT.^{22,50} Somit bewirkt SHP eine Inhibitor der Gallensäuren-Synthese, Gluconeogenese und Fettsäurensynthese und im Interstitium eine Hochregulation von FGF-15/19.⁵⁶

LXR und RXR binden zum Beispiel intrazellulär aus Cholestrin gebildete Oxysterole⁵⁷ bzw. Gallensäuren und aktivieren als Heterodimer mit RXR die Transkription von Enzymen des Lipidstoffwechsels. Die Umwandlung von Cholesterin zu Gallensäure wird begünstigt (LXR), ebenso die Biotransformation von Gallensäure zu besser wasserlöslichen Verbindungen.⁵⁸

<i>FXR Wirkung</i>	Induktion	Hemmung
Gallensäurenstoffwechsel	- GS-Sekretion (<i>BSEP</i>)	- GS-Synthese (<i>CYP7A1</i>) - GS-Aufnahme (<i>ASBT</i>)
Glukosestoffwechsel	- Insulinsensitivität (<i>Insulin-rezeptor</i>) - Insulinproduktion (<i>GLUT-2</i>)	- Glukoneogenese (<i>PEP-CK</i>)
Lipidstoffwechsel	- Triglyzerid-Clearance (<i>Apolipoprotein C-III</i>) - LDL-Cholesterin (<i>Cholesterinester-Transferprotein</i>)	- Triglyzeridsynthese (<i>SREBP-1c</i>) - VLDL Bildung (<i>Mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein</i>) - HDL-Cholesterin (<i>Cholesterinester-Transferprotein, HDL-Rezeptor</i>)
Inflammation		NF-KB, TNF- α , iL-1 β , IgM, CRP
Fibrose	- Matrix-Degradation (<i>matrix metalloproteinase-2</i>) - Apoptose hepatischer Sternzellen (<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)	-Aktivierung hepatischer Sternzellen (<i>PDGF</i>) - Fibrogenese (<i>TGF-β1</i>)
Atherosklerose	- Vasodilatation (<i>eNOS</i>)	- Inflammation (<i>COX-2, IL-1</i>) - Kalzifikation (<i>JNK</i>) - Migration von <i>smooth muscle cells</i> (<i>PDGF</i>)

Tabelle 3: Auswirkung von FXR auf den Gallensäure-, Glukose, und Lipidstoffwechsel, Inflammation, Fibrose und Atherosklerose

1.3 Das Fettgewebe als endokrines und immunologisches Organ

1.3.1 Zusammensetzung und Funktion

Das Fettgewebe ist oft mit einem negativen Bild in Verruf gebracht und wird mit Fettleibigkeit und einem ungesunden Lebensstil assoziiert. Lange Zeit war das Fettgewebe nur als Energiespeicher bekannt.⁵⁹ Es ist eine Bindegewebsform (mesenchymales Gewebe), die Energie aus hauptsächlich Glukose und Fettsäuren verschiedener Quellen in Form von Triglyzeriden speichert (Lipogenese).⁶⁰ Jeder Adipozyt wird von einer Basallamina umgeben und kann sein Volumen durch den Gehalt an Triglyzeriden um den Faktor 1000 ändern. Seit kurzem weiß man jedoch, dass das Fettgewebe noch viel mehr leistet: es schüttet aktive Botenstoffe aus⁶¹ und ist damit das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers.

Fettzellen entstehen aus fibroblastischen Prä-Adipozyten. Genregulatorische Proteine wie Angehörige der PPAR-Familie (peroxisome proliferator activated receptor) sind entscheidend für die Differenzierung zur Fettzelle.^{62,63}

Die kleinen Lipid-Tröpfchen innerhalb einer Zelle verschmelzen im Verlauf zu größeren Fetteinschlüssen. Vollständig differenzierte Adipozyten sind nicht mehr teilungsfähig.⁵⁹ Eine ausgereifte weiße Fettzelle besteht aus einer großen Lipidvakuole, die etwa 95% des Gesamzellvolumens ausmacht und durch eine monomolekulare Phospholipidschicht vom Zytoplasma getrennt wird. Das Zytoplasma und der Zellkern werden an den Rand gedrängt. Die Konfiguration des verbleibenden Zytoplasmas und plattgedrückten Zellkernes am Rand wird auch „Siegelringform“ genannt.⁶⁴

Es gibt zwei Formen: das braune plurivakuoläre Fettgewebe und das weiße univakuoläre Fettgewebe.⁶¹ Während das braune Fettgewebe vor allem bei Neugeborenen vorkommt und durch eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung durch UCP-1 in den Mitochondrien Wärme bildet, dient das weiße Fettgewebe insbesondere als Bau- und Speicherfett, ferner auch als endokrines und immunologisches Organ.⁶⁵ Sowohl auf die Fettzelle einwirkende Faktoren als auch selbst abgegebene Faktoren werden komplex durch endokrine und neuronale Faktoren reguliert. In der Orbita, den großen Gelenken, Hand- und Fußsohlen dient es vor allem als Baufett, als Speicherfett u.a. in Bauchhaut, Mesenterien und retroperitonealem Bindegewebe.⁶³ Bei der immer häufiger auftretenden Krankheit der Fettleibigkeit (Adipositas) kommt es nicht nur zu einer Zunahme des Fettgehaltes (adipozytäre Hypertrophie) innerhalb einer Fettzelle, sondern auch zu einer Zunahme der Gesamzellzahl (adipozytäre Hyperplasie).⁶⁰ Als eigenes Kompartiment, in

dem sich Lipophile in hoher Konzentration anreichern können, hat dies insbesondere eine hohe Bedeutung für die Verteilung von z.B. Medikamenten oder Giftstoffen.^{63,66}

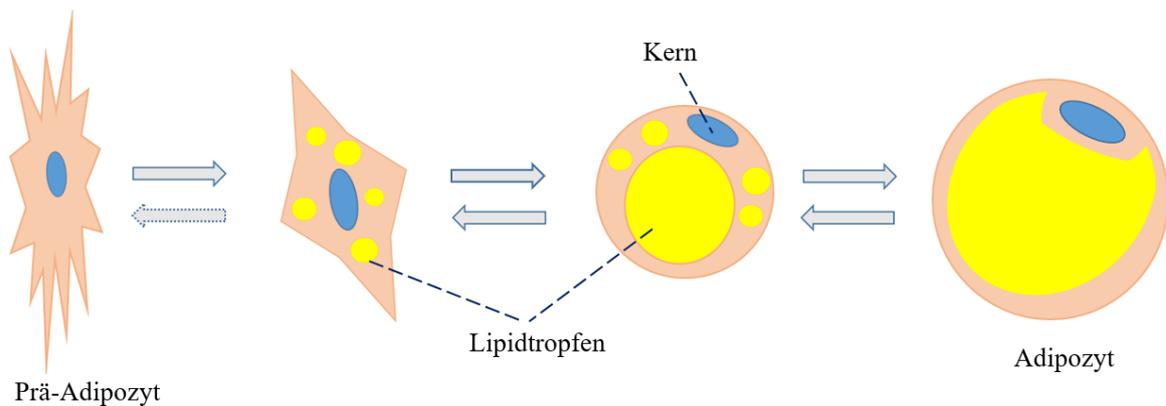


Abbildung 4: Schematisch dargestellte Entwicklung einer weißen Fettzelle n.⁶³ Abb. 3.2.60 mit freundlicher Genehmigung (Welsch, Histologie Das Lehrbuch, 5. Auflage 2018 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München). Die kleinen „lipid droplets“ innerhalb einer Zelle verschmelzen im Verlauf zu einer großen Lipidvakuole, in der Triglyzeride gespeichert werden. Der Zellkern und das Zytoplasma werden an den Rand gedrängt.

Zur Energiegewinnung werden die Lipide intrazellulär wieder durch zytosolische Lipasen gespalten (Lipolyse). Insulin stimuliert die Lipogenese, hingegen hemmt es die Lipolyse. Adrenalin und Noradrenalin gehören zu den wichtigsten Vertretern der prolipolytischen Hormone.⁶⁷⁻⁶⁹ Die antilipolytischen Effekte werden über eine cAMP-Spiegel-Erniedrigung induziert.⁶⁰ Die im weißen Fett gespeicherten Triacylglyceriden (TAG) werden in freie Fettsäuren (FFA) gespalten. Die freien Fettsäuren dienen dem Körper jedoch nicht nur zur Energiegewinnung, sondern auch zur Hormonsynthese⁷⁰ und Bildung von Zellmembranen⁷¹.

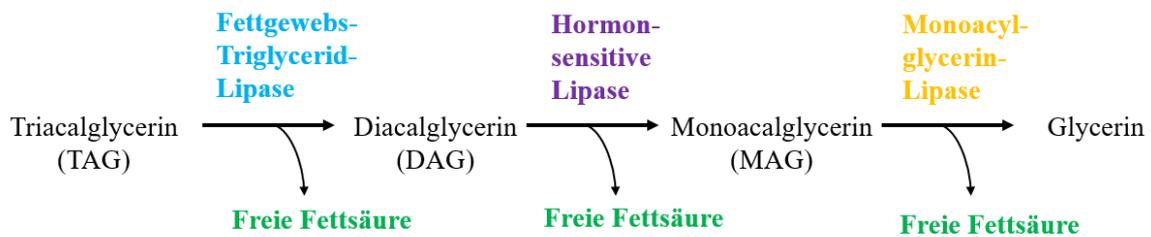


Abbildung 5: Mechanismus der Lipolyse von Triacylglycerinen. ⁷² Die Erklärung der Schritte erfolgt im Text.

Für den ersten und auch geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur vollständigen Spaltung von Triacylglycerinen in Fettsäuren ist die Adipozyten-Triglycerid-Lipase notwendig. Sie spalten von dem TAG eine Fettsäure ab, wodurch ein Diacylglycerid verbleibt. Diacylglyceride werden im Anschluss durch Hormon-sensitive Lipase hydrolysiert, wodurch eine weitere freie Fettsäure abgespalten wird. Im letzten Schritt spaltet die Monoacylglyceridlipase das verbliebene Monoacylglycerid in Glycerin und eine dritte freie Fettsäure. ⁷³⁻⁷⁵ Die so freigegebenen Fettsäuren werden in die Blutbahn abgegeben und in die Leber-Hepatozyten transportiert. Im Rahmen der mitochondrialen β -Oxidation werden die langkettigen Alkylreste schrittweise abgebaut und anschließend über den Citrat-Zyklus der Atmungskette zur Energiegewinnung zur Verfügung gestellt.

Die Speicherkapazität des Fettgewebes ist jedoch limitiert. Kommt es zu einer Anhäufung von Fetten (insbesondere von TAG), kann es als Folge zu Funktionsstörungen anderer Organe wie der Leber und der Muskulatur kommen. Erhöhte Fettsäure-Spiegel sind eng mit der Entwicklung eines metabolischen Syndroms verbunden. Die erhöhten Fettsäurespiegel im Blut bewirken u.a. eine gesteigerte Fettaufnahme und Speicherung im Pankreas, was die Entwicklung einer Insulinresistenz und Abnahme der Beta-Zellfunktion bewirken kann ⁷⁶⁻⁷⁹. Dass das Fettgewebe nicht nur ein Energiespeicher, sondern auch über die Produktion von sog. Adipokinen ein aktives endokrines Organ ist, wurde mit der Leptin-Entdeckung 1994 anerkannt ^{80,81}.

Während hypertrophe Riesenzellen stark insulinresistent sind, entstehen hyperplastische Fettzellen im Rahmen des „adipose tissue remodeling“: die Präadipozyten teilen sich mitotisch und differenzieren sich weiter zu reifen Adipozyten. ⁸² Ausdifferenzierte

Adipozyten sind nicht mehr teilungsfähig, sodass neue Adipozyten rekrutiert werden müssen. Die kleinen Adipozyten reagieren im Vergleich jedoch hochsensibel auf Insulin, was bei Adipösen eine unterschiedliche Insulinsensibilität erklärt.⁵⁹

1.3.2 Inflammation des Fettgewebes

Darüber hinaus kann Adipositas zu einer chronischen, subklinischen Infektion führen. Bei Patienten mit Krankheiten wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 zeigen sich häufig erhöhte CRP (C-reaktives Protein)-Konzentrationen im Serum – ein Marker für Entzündungsreaktionen. Es gibt Spekulationen, dass wohlmöglich ein erhöhter CRP-Wert sogar als Prädiktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus verwendet werden kann^{83,84}.

In verschiedenen Mausmodellen wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Inflammation und Adipositas nachgewiesen: mit zunehmender Fettmasse kommt es im Verlauf zu einer steigenden Makrophagenzahl⁸⁵. Auch bei adipösen Patienten konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Gewichtsabnahme (z.B. nach einer bariatrischen Operation) und einer Verringerung der Makrophagenzahl gezeigt werden⁸⁶. Eine besondere Rolle für die Immunzellinfiltration scheint das viszerale Fettgewebe zu spielen⁸⁷.

Unklar ist jedoch, ob dieser Zusammenhang für jeden Menschen zutrifft und welchen Einfluss der Faktor Zeit auf die reversible Fettgewebsinflammation hat⁸¹. Ob weitere Faktoren wie Umwelteinflüsse oder genetische Mechanismen relevante Auswirkungen haben, wurde bisher nicht geklärt.

Makrophagen sind als Zellen des Immunsystems bekannt. Sie werden in „klassisch aktivierte“ pro-inflammatorische M1- und „alternativ aktivierte“ anti-inflammatorische M2-Makrophagen unterteilt und spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase und Pathologie entzündlicher Erkrankungen.⁸⁸ Die Aktivierung der M1-Makrophagen erfolgt durch Toll-like Rezeptorliganden (wie Lipopolysaccharide) und Interferon- γ und umfasst die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23) und Chemokine (z.B. CXCL9 und CXCL10), sowie induzierbarer Stickoxidsynthasen und Stickoxid.^{89,90} M1-Makrophagen zeigen starke mikrobizide Eigenschaften und fördert IL-12-vermittelte Th1-Reaktionen⁹¹.

M2-Makrophagen sind hingegen heterogener. Sie werden überwiegend durch die TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 aktiviert, jedoch können auch weitere Zytokine, wie das regulatorische Zytokin IL-10 ihre Entwicklung beeinflussen⁹². Sie exprimieren Arginase 1, den Mannose-Rezeptor CD206 und die IL-4-Rezeptor- α -Kette⁹⁰ und werden z.B. in T2-Helferzell (TH2)-Reaktionen, parasitären Infektionen, bei Allergien, in der Tumorentwicklung und in Wundheilungsprozessen nach Gewebsverletzungen gelockt⁹¹. Die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wird durch M2-Makrophagen hochreguliert, wohingegen die Synthese proinflammatorischer Zytokine reduziert wird. Odegaard et al. berichteten darüber, dass die Regulation mehrerer Gene in M2-Makrophagen u.a. durch die Transkriptionsfaktoren Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ (PPAR γ) und PPAR δ reguliert werden.⁹³

Lumeng et al. zeigten, dass Makrophagen im Fettgewebe fettleibiger Mäuse hauptsächlich mit einem M1- Makrophagen-Phänotyp-Gen assoziiert sind. Dahingegen sind die Fettgewebsmakrophagen von mageren Mäusen überwiegend mit M2-Makrophagen- Phänotyp-Genen assoziiert.⁹⁴

Es lässt sich daraus vermuten, dass das metabolische Syndrom keine einfache entzündliche Erkrankung darstellt, sondern eine Störungen der Makrophagenaktivierung mit einhergehendem Verlust der metabolischen Koordination und dass M1-Makrophagen die Insulinresistenz fördern und M2-Makrophagen vor durch Fettleibigkeit induzierter Insulinresistenz schützen.⁹⁵

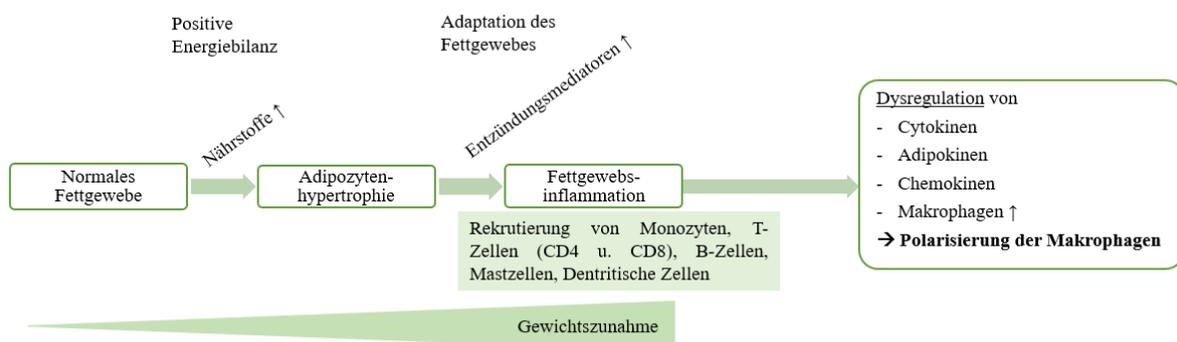


Abbildung 6: Die Grafik zeigt schematisch die Entstehung der Fettgewebsinflammation. Durch eine chronisch positive Energiebilanz kommt es zu einer Hypertrophie der

Adipozyten. Die Immunantwort wird aktiviert, was zu einer Entzündung des Fettgewebes führen kann. Modifiziert n.⁹⁶, S.1606, mit freundlicher Genehmigung von M. Blüher.

Zu früheren Zeiten musste der Mensch sich bewegen, um Nahrung und somit seine Existenz zu sichern. Heutzutage haben wir ein chronisches Nahrungsüberangebot, wodurch bei vielen Menschen eine positive Nahrungsbilanz resultiert und es zu einer Fettzellhypertrophie mit folgender Gewichtszunahme kommt. Die Zellhypertrophie verursacht zellulären Stress und kann eine Reihe von inflammatorischen Kaskaden aktivieren⁹⁷. Der zelluläre Stress aktiviert intrazelluläre Stresskinasen (u.a. Jun-N-Terminal-Kinase JNK, *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells* NF-κB, *apoptosis signal-regulating kinase 1* Ask1, *mitogen activated protein kinase kinase 4* MKK4), die wiederum die Freisetzung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren (IL-6, TNF-α, IL-1β, MCP-1, PAI-1, CSF-1) und Adipokine (Progranulin) bewirken^{81,98}. Durch die Entzündungsmediatoren werden Immunzellen (Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen und Dendritische Zellen) rekrutiert.

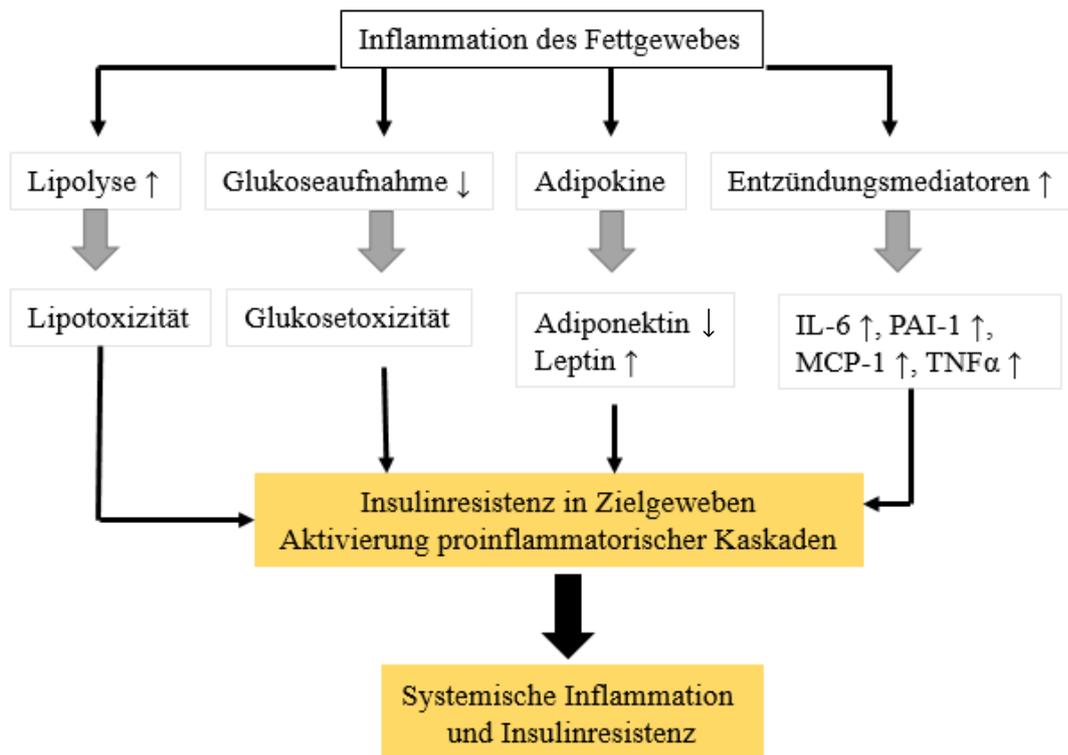


Abbildung 7: „Schematische Darstellung der Entstehung einer systemischen Inflammation und Insulinresistenz aus der Inflammation des Fettgewebes“, n. ⁹⁶, S.1609 mit freundlicher Genehmigung von M. Blüher. IL-6 Interleukin-6, PAI-1 Plasminogenaktivatorinhibitor 1, MCP-1 *monocyte chemotactic protein 1*, TNF Tumornekrosefaktor.“

Zusätzlich werden vermehrt Fettsäuren freigesetzt. Die basale sowie durch Katecholamine induzierte Lipolyse erklärt das Zustandekommen der miteinhergehenden Insulinresistenz ^{86,87,99,100}. Inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF aktivieren Signalwege, die direkt die Insulinsignaltransduktion negativ beeinflussen. TNF- α aktiviert beispielsweise die NF- κ B-Signalkaskade, sowie die Expression von SOCS-3 (*Suppressor of Cytokine Signaling*). Beides begünstigt eine Insulinresistenz ¹⁰¹. Auch eine wesentliche Rolle für die Entstehung einer Insulinresistenz spielen die Aktivierung der JNK und Degradation von Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS-1) ¹⁰².

1.3.3 Adipokine

Adipokine wirken als Fettgewebshormone, die im Serum zirkulieren und metabolische, kardiovaskuläre, sowie immun-modulierende Wirkung haben.¹⁰³ Bisher sind etwa 100 Sekretionsprodukte des Fettgewebes bekannt, u.a. Leptin, Adiponektin, Resistin und TNF- α .¹⁰⁴ Die Serumspiegel einiger Adipokine können mit der Fettgewebsmasse positiv (Leptin) oder negativ (Adiponektin) korrelieren.

Leptin ist ein wichtiger Regulator der Nahrungsaufnahme, indem es den Appetit beeinflusst. Ende 1994 wurde das "obese"-Gen (ob-Gen) und sein Genprodukt Leptin (leptos: dünn) in Mäusen identifiziert.¹⁰⁵ Leptin ist das „Sättigungshormon“ und wird hauptsächlich von Adipozyten, aber auch von Magen und Muskeln exprimiert.¹⁰⁶ Es reguliert die Nahrungsaufnahme und Energiebalance, indem es über den Mechanismus einer Feedbackhemmung das Auftreten von Hungergefühlen hemmt und so eine wichtige Rolle in der Regulierung des Fettstoffwechsels spielt.¹⁰⁷ Der Leptin-Serumspiegel steigt mit zunehmender Fettmasse an.¹⁰⁸

Zusammengefasst übt Leptin zwei Hauptfunktionen aus: es wirkt über das Neuropeptid Y (NPY) vermittelt dem Hunger entgegen und bewirkt bei erhöhtem Spiegel einen gesteigerten Verbrauch von Sauerstoff für die Verbrennung von Glukose, einen Anstieg der Körpertemperatur und einen Abbau des Fettdepots aus den Fettzellen.¹⁰⁹

Die Funktion von Leptin reicht jedoch über die Kontrolle der Nahrungsaufnahme hinaus. Leptin ist nicht nur ein Schlüsselregulator des endokrinen Systems und der hypothalamisch-pituitär-adrenalen Achse¹¹⁰, sondern auch in der Angiogenese¹¹¹, sowie Knochenbildung¹¹². Darüber hinaus übernimmt Leptin auch eine ausschlaggebende Rolle in der Modulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Dies lässt sich durch die strukturellen Ähnlichkeiten von Leptin mit den Zytokinen der langkettigen helikalen Familie (Interleukin (IL)-6, IL-11, IL-12 und Oncostatin-M erklären.¹¹³⁻¹¹⁵ Aufgrund seiner Immunaktivitäten kann Leptin den Ernährungszustand mit T-Helfer(Th)1-Immunreaktionen verknüpfen. So führt eine Abnahme der Plasma-Leptinspiegel typischerweise zu einer Beeinträchtigung der Immunfunktion. Zum Beispiel sind die Leptinwerte während des Hungers und bei Unterernährung niedrig. Diese Bedingungen sind mit thymischer Atrophie und geschwächten Immunantworten verbunden.¹¹⁶

Leptin ist folglich ein Mediator bei inflammatorischen Prozessen. Es hat pro-inflammatorische Eigenschaften und mehrere Aktionen ähnlich denen der akuten Phase

Reaktanten und reguliert die Sekretion von entzündlichen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-12. ¹¹⁶

Adiponektin wird ausschließlich in Fettzellen gebildet. Das Adipokin besteht aus 247 Aminosäuren ¹¹⁷ und bewirkt eine Verbesserung der Insulinsensitivität und ist somit maßgeblich an der Regulation des Blutzuckers beteiligt, sowie fördert es eine intensivierete Lipidoxidation. ¹¹⁸ Der Serumspiegel sinkt mit zunehmender Masse an Fettgewebe. Die Adiponektin-Spiegel korrelieren positiv mit HDL-Cholesterin, negativ mit dem BMI, HbA1c-Wert, Triglyzeriden, Apolipoprotein B-100, C-reaktivem Protein und Fibrinogen. ^{119,120} Es wirkt der Entstehung von Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 entgegen. Auch eine antientzündliche und antiatherogene Wirkung ist bekannt ¹²¹.

Resistin wirkt pro-diabetisch, pro-inflammatorisch und pro-adhäsiv. ¹²² Der Name „Resistin“ wird abgeleitet von „resistance to insulin“. ¹²³ Obwohl seine Expression ursprünglich in Lunge und Adipozyten definiert war, wird Resistin hauptsächlich in mononukleären Leukozyten, Makrophagen, Milz- und Knochenmarkszellen exprimiert. ¹²⁴ Es deutet immer mehr darauf hin, dass Resistin neben seiner Rolle bei der Insulinresistenz und Diabetes ⁶¹ auch bei einer Vielzahl von weiteren Prozessen eine wichtige regulatorische Rolle spielt: Atherosklerose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, alkoholfreie Fettlebererkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Malignität, Asthma, entzündliche Darmerkrankungen und chronische Nierenerkrankung. ¹²⁴

Visfatin ist ein potentieller Biomarker für Adipositas, Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, aber auch Arteriosklerose und durch seine immun-modulierende Wirkung auch für Entzündungen. Es wird vom viszeralen Fettgewebe sezerniert. Meist korreliert die systemische Visfatin-Konzentration mit der viszeralen Fettgewebsmasse. Es wurde aber auch eine positive Korrelation mit nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen, dem polyzystischen Ovarialsyndrom und arterieller Hypertonie beobachtet. ^{125–127}

Ghrelin wird vor allem in den neuroendokrinen Zellen des Magens und in Neuronen des Hypothalamus freigesetzt und ist an der Steuerung der GH-Sekretion der somatotrophen Zellen der Hypophyse beteiligt. ¹²⁸ Das Hormon gelangt über die Blutbahn zu speziellen Zellen des Hypophysenvorderlappens, wo es an den GHS-Rezeptor (Growth Hormone Secretagogue Receptor) bindet, wodurch die Freisetzung von Growth Hormone stimuliert wird. Neben der Freisetzung von Growth Hormone verstärkt Ghrelin das Hungergefühl.

¹²⁹ Auf diese Weise herrscht ein Antagonismus zwischen Ghrelin und Leptin. Die Wirkungen von Ghrelin sind zahlreich, sodass viele seiner Angriffspunkte im Energiestoffwechsel noch nicht abschließend geklärt sind. ^{109,122}

1.3.4 Chemokine

CC-Chemokin-Ligand-2 (Synonym: MCP-1)

CCL-2 ist ein Zytokin, das Monozyten, T-Gedächtniszellen und Dendritische Zellen zu Infektions- und Entzündungsherden lockt. CCL2 gehört in die Familie der CC-Chemokine mit 24 Mitgliedern und ist auf dem Chromosom 17q11.2 lokalisiert. ¹³⁰ CC-Chemokine oder auch β -Chemokine enthalten zwei direkt benachbarte aminoterminalen Cysteinreste. Es liegt als Monomer vor und bindet an den zellulären Rezeptor CCR2, einen G-Protein gekoppelter Rezeptor. ¹³¹ Außer im Fettgewebe wird es zusätzlich von glatten Muskelzellen, Monozyten und Endothelzellen sezerniert ¹³².

CCL-2 hat wie viele Chemokine vielfältige Funktionen, vor allem besitzt es eine inflammatorische Wirkung: CCL-2 wirkt auf Monozyten und Basophile Granulozyten chemotaktisch und induziert so bei Krankheiten wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis und Atherosklerose ¹³⁰ ein Monozyteninfiltrat und bewirkt bei Basophilen Granulozyten und Mastzellen eine Degranulation. Makrophagen stammen aus dem Knochenmark ab und werden als Monozyten ins Blut abgegeben. Nach dem Kontakt mit aktivierten Endothelzellen differenzieren sie sich zu Makrophagen, die schließlich u.a. in das Fettgewebe einwandern. Dieser Vorgang wird chemotaktisch über CCL-2 und dessen Rezeptor vermittelt. Die Interaktion zwischen Makrophagen, Adipozyten und Endothelzellen bewirkt eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, u.a. TNF- α . ^{133,134}

1.3.5 Rezeptoren

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (kurz: PPARs) sind intrazelluläre Rezeptoren, die über einen physiologischen oder pharmakologischen Liganden aktiviert werden. Sie gehören zur Familie der Kernrezeptoren und regulieren als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen. ¹³⁵ Im menschlichen Organismus sind bisher drei PPAR-Subtypen (α , β/δ , γ) bekannt, die sich in ihrer Lokalisation und auch hinsichtlich ihres Genexpressionsmusters unterscheiden. ¹³⁶

PPAR γ wird ubiquitär, aber hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert. Die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors steigert die Aufnahme freier Fettsäuren und wirkt auf die Differenzierung von Adipozyten und Makrophagen, sowie stimuliert es die Transkription von Genen für den intrazellulären Fettsäuretransport und für die Lipidsynthese.¹³⁷⁻¹³⁹

Agonisten von PPAR γ fördern außerdem die Transkription von GLUT4 und steigern dadurch den Glukoseeinstrom in die Zellen und bewirken somit insbesondere eine Verbesserung des Glucosestoffwechsels sowie der Insulinsensitivität.^{40,140} Eine Verbesserung der Insulinsensitivität erklärt sich dadurch, dass der PPAR- γ -Agonist der Wirkung von TNF- α in Adipozyten entgegenwirkt¹³⁶.

Darüber hinaus hat auch die Aktivierung von PPAR γ antiinflammatorische Effekte.

Letztlich konnte auch eine Assoziation zwischen der PPAR γ -Rezeptor-Aktivierung und einer Reduktion des Arteriosklerose-Risikos belegt werden.¹⁴¹

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Veränderungen der peripheren Gallensäurekonzentrationen im Serum wurden bereits nach Mischmahlzeiten aus metabolischer und endokriner Perspektive untersucht. Sobald Mischmahlzeiten bestehend aus Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden in verschiedenen Kombinationen verwendet werden, ergibt sich so jedoch eine Unsicherheit in der Interpretation der Daten. Um die Wirkung besser differenziert betrachten zu können, müsste man die Makronährstoffe in einer Mahlzeit voneinander trennen. In einer in jüngerer Vergangenheit durchgeführten Studie wurde bereits die isolierte Wirkung von Kohlenhydraten in Form eines Oralen Glukosetoleranztestes auf die Gallensäurekonzentrationen durchgeführt ¹⁴². Zur isolierten Wirkung von oral aufgenommenen Lipiden auf die systemische Gallensäurekonzentration sind jedoch doch keine Studiendaten vorliegend.

Verschiedene Studien zu oraler Fettaufnahme (*oral lipid ingestion*, OLI) und ihren Auswirkungen auf diverse Serumparameter wurden in der Vergangenheit bereits durchgeführt. Deren Aussagekraft ist jedoch in Bezug auf die Auswirkung der oralen Lipid-Aufnahme limitiert, da i. d. R. bei diesen experimentellen Ansätzen die Lipidlösung auf Milch oder Creme beinhaltender Nahrungspräparate mit Anteilen von Kohlenhydraten und Proteinen basierte.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher zu untersuchen, ob die Konzentrationen von 18 verschiedenen primären, sekundären und tertiären konjugierten und nicht-konjugierten Gallensäuren sich im Serum von n = 100 gesunden Personen während eines oralen Lipidtoleranztests (OLTT) mit einer kohlenhydrat- und proteinfreien Lipidlösung verändern.

Das Besondere dieser Arbeit ist es also, dass die Auswirkung von reinen Triglyzeriden und freien Fettsäuren analysiert wurde. Potentielle Nebeneffekte durch Proteine oder Kohlenhydrate wurden reduziert, sodass eine spezifische Zuordnung der Effekte möglich ist.

Die Gallensäuren im Serum wurden durch LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie) qualifiziert und quantifiziert. Des Weiteren galt es herauszufinden, ob anthropometrische Parameter den zeitlichen Verlauf von Gallensäuren nach der oralen Fettbelastung beeinflussen. Ein besonderes Augenmerk der Studie lag auch darauf

herauszufinden, ob Veränderungen des Serum-Gallensäure-Metabolismus während der OLTT mit Schwankungen im Serum FGF-19-Spiegel korrelieren.

Die Auswirkungen der durch eine kurzfristig erhöhte Fettsäure-Zufuhr beeinflussten Gallensäuren auf die im Blut zirkulierenden Konzentrationen der betrachteten Parameter sollten mit *in vitro* Experimenten verglichen werden.

Es galt herauszufinden, wie Gallensäuren auf die Genexpression von Proteinen, die an Gallensäuresignalen beteiligt sind, Adipokinen und immunmodulierenden Zytokinen und die basale Lipolyserate wirken. Hierzu wurden murine 3T3-L1 Adipozyten über 8 Tage hormonell differenziert und anschließend mit verschiedenen Gallensäuren stimuliert. Die hormonell differenzierte 3T3-L1 Zelllinie ist ein etabliertes Zellkultur-Modell. Die verwendeten Gallensäuren beinhalteten primäre (u.a. CA, CDCA), sekundäre (u.a. DCA, LCA) und tertiäre (u.a. UDCA) Gallensäurespezies in ihren freien sowie Taurin (T-) - und Glycin (C-) - konjugierte Formen. Die Genexpression der Proteine wurde mittels quantitativer PCR gemessen und die Proteinsekretion mittels ELISA-Techniken bewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Geräte

Sicherheitswerkbank KL.II 120cm	Thermo Scientific MSC-Advantage
CO2 Inkubator 150 Liter	Heracell 150i
Gefrierschrank GP4013	Liebherr
Ultraschallhomogenisator HD3100	Bandelin
Mobil-Absaugsystem 4000 ml mit Platte	
Analysenwaage Kern ACJ 220-4M, 220g/0,1 mg	
Wasserbad, 4-12 Liter	memmert
Thermomixer F1.5	Eppendorf
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph
Mikroliterzentrifuge Mikro 120	Hettich
Mikroliterzentrifuge Mikro 200 R,	Hettich
Tischzentrifuge Rotina 380 R,	Hettich
Mikroplatten Spektralphotometer Epoch (inkl. Take3 MV-Platte)	BIO-TEK
Real-Time PCR System Modell CFX Connect	BioRad
Chemilumineszenz- und Fluoreszenzsystem	
Inverses Mikroskop Modell DM IL LED	Leica
T100 Thermal Cycler	BioRad
-80°C-Schrank HFU600TV	Thermo Fisher

Gefrierschränke GNP 3013/EX (explosionssgeschützt)	Liebherr/Vaust
Pipetten und Zubehör	Eppendorf, Greiner Bio-One
orbital incubator SI500	Stuart
Mixer Uzusio VTX 3000L	LMS
Magnetrührer basic 2	

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

EDTA Monovette Serumröhrchen	Sarstedt
ELISA-Platte (96 Loch)	Corning Costar®
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
QIAshredder	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Sterile Filterspitzen (1250 µl)	Sarstedt
Sterile Filterspitzen (10 µl , 100 µl, 200 µl)	Nerbe Plus
Sterilfilter (0,22 µm Porengröße)	Nalgene®
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (12-Loch)	Greiner Bio-One™ CellStar™
Zellkulturschalen (10 x 2 cm)	BD Falcon
Zellschaber	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Glycerol Enzyme Mix	BioVision
iScript reverse transcriptase	Biorad
Taq DNA Polymerase	Biorad
apo-Transferrin	Sigma
Ascorbat	Sigma
Biotin	Sigma
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Corticosteron	Sigma
DEPC	Fluka
DMEM (4,5g/l Glukose)	Lonza
Fetuin	MP
IBMX	Serva
Insulin (bovin)	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Nukleasefreies Wasser	Promega
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN
Panthothensäure	Sigma
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
B-TMCA	Steraloids Inc
CA	Sigma
DCA	Sigma
TDCA	Sigma

2.1.4 Kit-Systeme

BCA Protein Assay Kit	Pierce
Cytotoxicity Detection Kit LDH	Roche
Duo Set Elisa Development System mouse Leptin	R&D Systems
Duo Set Elisa Development System mouse CCL-2	R&D Systems
Duo Set Elisa Development System mouse PPAR γ	R&D Systems
Reverse Transcription System	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
iTag Universal Syrb Green Mix	BioRad
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad
Free Glycerol Colorimetric/Fluorometric Assay Kit	BioVision
RNase-Free DNase Set	Qiagen

2.1.5 Puffer und Lösungen

Ethanol 70%:

Ethanol 70 ml

DEPC-Wasser 30 ml

DEPC-Wasser:

DEPC 1 ml

ad 1 l ddH₂O

2.1.6 Murine Zellkultur der Zelllinie 3T3-L1

Anzuchtsmedium DMEM	1% Penicillin Streptomycin 10% Newborn Calf Serum
DMEM F-12 Differenzierungsmedium I	1% Penicillin Streptomycin 5% Fetal Calf Serum Apo-Transferrin 2 µg/ml (stabil) Panthothensäure 17 µM (stabil) Biotin 1 µM (stabil) Fetuin 300 µg/ml (stabil) Insulin 100 nM (frisch zugesetzt) Ascorbat 200 µM (frisch zugesetzt) Corticosteron 1 µM (frisch zugesetzt) IBMX 20 µM (frisch zugesetzt)
DMEM F-12 Hochinsulin Differenzierungsmedium II	1% Penicillin Streptomycin Insulin 1 µM (frisch zugesetzt)
DMEM F-12 Kultivierung	1% Penicillin Streptomycin

2.1.7 Primer

Primer	Orientierung	Sequenz
CCL-2	Forward	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG -3'
	Reverse	TCTGGACCCATTCCTTCTTG -3'
Leptin	Forward	5'-AGGATCTGAGGGGTGATGTG-3'
	Reverse	5'-AGGTGACCAAGGTGGCATAG-3'
PPAR γ	Forward	5'- TTATAGCTGTCATTATTCTCAGTGGAG
	Reverse	CAGCACCTGCCTTAAGTTGA -3'
GAPDH	Forward	5'-TGTCCTGTCGTGGATCTGAC-3'
	Reverse	5'-AGGGAGATGCTCAGTGTGG-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Studienkohorte

Die Studie wurde am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt und repräsentiert ein Kollektiv von 100 gesunden Probanden im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, die zuvor ihre schriftliche Einwilligung gegeben haben. Zuvor wurde die Studie von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg genehmigt.

Es wurden in einer vorherigen Analyse bereits sämtliche anthropometrische und laborchemische Parameter bestimmt, sowie auch Marker der Adipokinregulation und FGF-19/FGF-21 nach der oralen Lipidbelastung^{143,144}. Das Probandenkollektiv teilte sich in 58 weibliche und 42 männliche Teilnehmer auf. 66 Probanden waren normalgewichtig (BMI zwischen 18 und 25 kg/m²), während 34 Übergewicht und Fettleibigkeit aufzeigten. Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme waren jegliche Art von Krankheit, akute (innerhalb der letzten 10 Tage vor der Durchführung des OLTT) oder chronische Infektionen und Medikamenteneinnahme (ausgenommen orale Kontrazeptiva). Um potentielle Störfaktoren zu minimieren, wurden auch Schwangere oder menstruierende Frauen aus der Studie ausgeschlossen.

Als Parameter wurden Alter, BMI, Hüft- und Taillenumfang, die Hautfaltendicke des Trizeps, sowie der Blutdruck gemessen. Auch Informationen über Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre Erkrankungen, orale Kontrazeption und Nikotinabusus wurden erfasst. Die vorherrschenden Charakteristika der Studienpopulation werden in der Tabelle 4 zusammengefasst.

2.2.2 Oraler Lipid Toleranztest (OLTT)

Der orale Lipid Toleranztest wurde nach einer Fastenperiode von 12 Stunden durchgeführt. Auch während des Tests, der 6 Stunden dauerte, durfte weder gegessen noch geraucht werden und die Studienteilnehmer hielten sich in körperlicher Ruhe. Die Fettemulsion musste von den Teilnehmern innerhalb von maximal 15 Minuten zu sich genommen werden. Das Trinken einer Menge von 500ml Flüssigkeit (reines Wasser) während der Durchführung war erlaubt.

Nach der Fastenperiode (0h) wurden im Abstand von 2 Stunden (2h, 4h und 6h) venöse Blutproben genommen, die anschließend für 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert wurden. Das gewonnene Serum wurde bei -20°C gelagert. Die verwendete Lipidlösung war protein- und kohlenhydratfrei (160 ml; 758.1 kcal; 75 g pflanzliches Fett aus Triglyzeriden, 9.2 g Fettsäuren aus rein pflanzlichen Ölen) und beinhaltete die folgenden Komponenten:

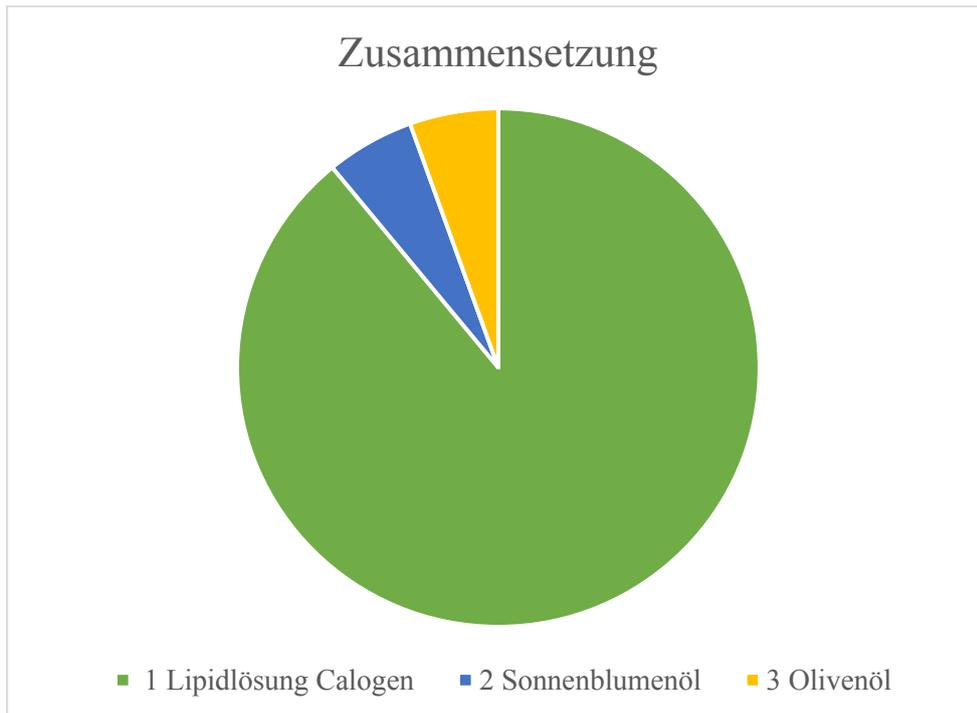


Abbildung 8: *Zusammensetzung der Lipidlösung des oralen Lipidtoleranztests aus den 3 Komponenten Calogen^R NUTRICIA-Neutral, Sonnenblumenöl und Olivenöl. Die detaillierte Zusammensetzung wird im folgenden Abschnitt beschrieben.*

Komponente 1:

150 ml Wasser/Fett Lösung (Calogen^R NUTRICIA-Neutral, Pfrimmer Nutricia, Erlangen, Germany) (675 kcal)

75 g pflanzliches Fett mit puren Triglyzeriden 7,95 g gesättigte Fettsäuren

45,6 g einfach-ungesättigte FS

21,45 g mehrfach-ungesättigte FS

69 g Wasser

0,15 g Kohlenhydrate (insignifikant geringe Menge)

Komponente 2:

5 ml (4,6 g; 41,5 kcal)

Sonnenblumenöl 10,2 % gesättigte Fettsäuren

26,3 % einfach-ungesättigte FS

63,5 % mehrfachungesättigte FS

Komponente 3:

5 ml (4,6g; 41,6 kcal)

Olivenöl 14 % gesättigte Fettsäuren

78 % einfach-ungesättigte FS

8 % mehrfach-ungesättigte FS

2.2.3 Gallensäurenquantifizierung HPLC-MS/MS

Die Messungen wurden in Kooperation mit der Abteilung Klinische Chemie und Labormedizin der Universitätsklinik Regensburg unter der Leitung von Dr. Gerhard Liebisch durchgeführt. Dort wurde ein geeignetes Verfahren entwickelt, welches ermöglicht, die einzelnen Gallensäurespezies schnell, sensitiv und auch schon in niedrigsten Konzentrationen zu bestimmen¹⁴⁵. Durch diese Kopplung können sowohl die Gesamtkonzentration, als auch deren einzelne Komponenten bestimmt werden.

Die verschiedenen Gallensäurespezies wurden durch LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) hochselektiv und sensitiv identifiziert und quantifiziert. Hierbei werden drei Massenspektrometer-Einheiten in Serie hintereinandergeschaltet (Tripel-Quadrupol), bei dem 2 MS als Ionenfilter (Tandem-MS) und das Dazwischenliegende als Fragmentierungsort wirken. Die Massenspektrometer sind an ein chromatographisches Trennsystem (Flüssigkeitschromatographie = LC) gekoppelt. Die Analyse sowohl von reinen Substanzen, als auch von Substanzgemischen ist möglich. Es erfolgt zunächst die Auftrennung, danach die Messung der Analysate.¹⁴⁶

Nach Ionisierung, die mittels Elektrosprayionisation (ESI) erfolgt, werden Analyten im elektromagnetischen Feld entsprechend ihrem Massen-Ladungsverhältnis aufgetrennt. Ein Detektor registriert Signale proportional zur Häufigkeit der auftreffenden Ionen. Die Identifizierung erfolgt nach Zeit (Beschleunigung).

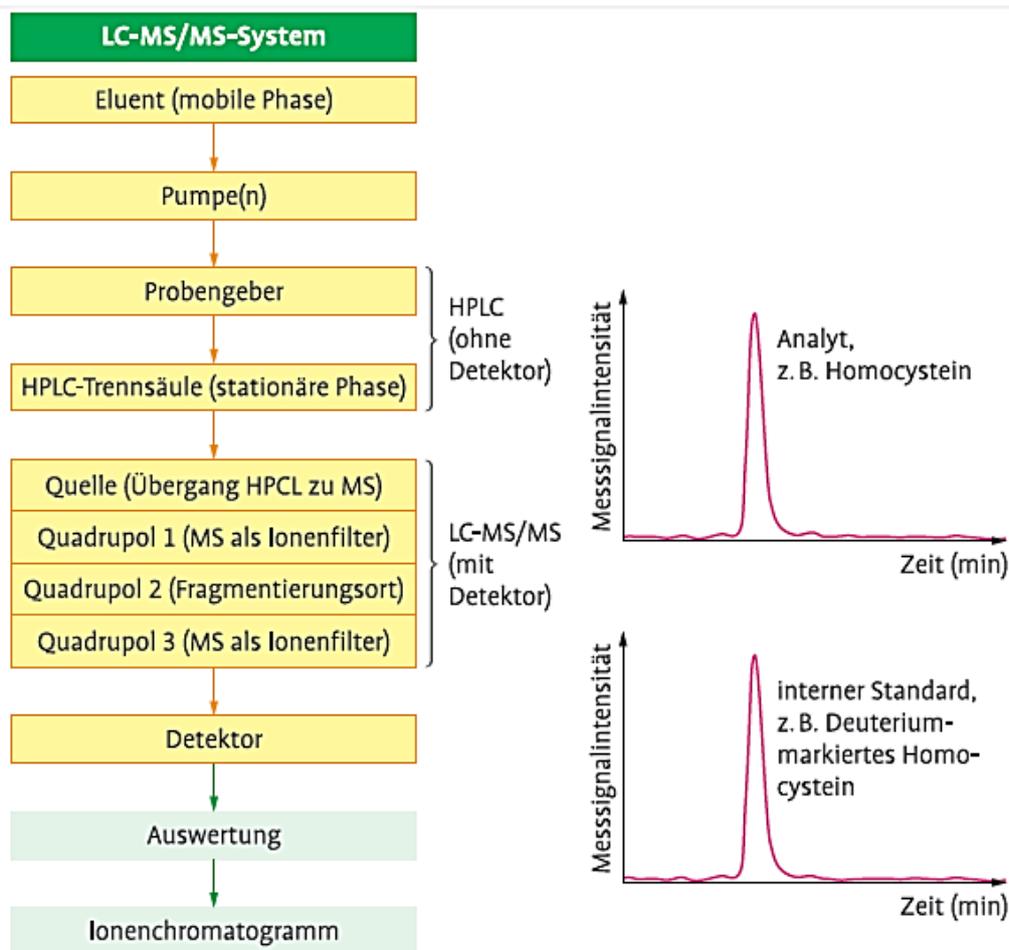


Abbildung 9: „Flussschema eines LC-MS/MS-Systems mit Ionenchromatogrammen. Das Verhältnis der Flächen unter dem Analytsignal und dem internen Standardsignal kann über eine Kalibrationsfunktion der Konzentration des Analyten in der Patientenprobe zugeordnet werden.“¹⁴⁶ Abbildung mit freundlicher Genehmigung von H.Renz.

Die Quadrupol-Trennsysteme bestehen aus vier Stabmagneten. Durch die Anlegung von Gleichspannungen werden Moleküle einer ganz bestimmten Masse beschleunigt, durch den Stabzwischenraum durchgeschleust und ausgefiltert. Störende Ionen werden neutralisiert, sodass sie nicht detektiert werden können. Durch Veränderung des elektrischen Feldes ist es sogar möglich, das gesamte Spektrum abzutasten. Diese Aufgabe übernimmt das erste MS im Tandem-Gerät: Das erste MS zeigt den gesamten Massenbereich an und trennt je nach Analyt eine Masse ab (Ion selektieren). Diese unterliegt in einer Stoßkammer einem „Zerkleinerungsprozess“ (Fragmentieren), bevor die zahlreichen Fragmente von dem letzten MS bestimmt werden (spezifische Bruchstücke). Eine Substanz kann dann anhand dieses Fragmentierungsmusters sehr selektiv identifiziert werden.^{146–148} Die Messungen erfolgen somit nur beim ersten und

beim dritten MS. Der mittlere Quadrupol (Stoßkammer) dient zum Zerspalten des vorher ausgesuchten Analyten mittels Zusammenstoß mit einem Gas (Argon oder Stickstoff).¹⁴⁹

Je schwerer die Ionen sind, umso stärker ist auch die Ablenkung: Ionen mit geringer Masse werden abgelenkt, da sie nicht ausreichend zur Mittellinie abgelenkt werden und entweichen; Ionen mit hoher Masse werden stärker zu negativ überlagerten Stäben abgelenkt und hier entladen.

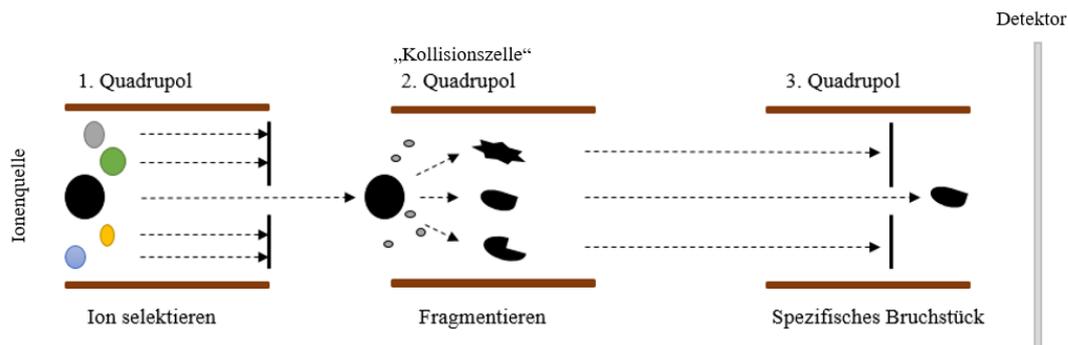


Abbildung 10: Aufbau eines Triple-Quad¹⁵⁰

Die Serumproben wurden vor der Proteinfällung mit einer Mischung aus deuterierten Gallensäuren als interner Standard gespickt. Die Serum-Extrakte wurden nach der Trennung der isobaren Spezies in der Basislinie einem LC-MS/MS-Nachweis im Negativ-Ionen-Modus unterzogen. Das LC-MS/MS-System bestand aus einer API 4000 QTrap (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland), die mit einer Elektrospray-Ionisation gekoppelt war. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einem Agilent 1200 HPLC-System (Agilent, Waldbronn, Deutschland). Die Quantifizierung erfolgte mittels eines durch Standardaddition erzeugten Matrixkalibrators.

2.2.4 Differenzierung muriner 3T3-L1 Adipozyten

Die verwendete Zelllinie 3T3-L1 stammt von disaggregierten Maus-Embryonen (American Type Culture Collection) ab. Sie wachsen als Fibroblasten in der Zellkultur zu einem dichten Zellrasen heran, solange bis das Phänomen der Kontakthemmung eintritt¹⁵¹. Innerhalb von 8 Tagen differenzieren sie sich durch Zusätze von Insulin, Glukokortikoiden und Wachstumsfaktoren zu Präadipozyten.

Die Kultivierung und Differenzierung von 3T3-L1 Zellen erfolgte nach einem festen Schema. Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturflaschen mit DMEM Medium im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Sobald eine 80-90% Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Die Zugabe von Trypsin während einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C trennte die interzellulären Kontakte und löste die Zellen voneinander und vom Flaschenboden. Nach anschließender Zentrifugation (6 min bei 1200 rpm) wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen, gezählt und in einer Dichte von 50000 Zellen in 2 ml in Zellkulturschalen (Lochplatten) mit frischem Anzuchtmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten wurden die Passagen 3 bis 8 verwendet. Durch die Umstellung vom Anzuchtmedium auf das Differenzierungsmedium I am darauffolgenden Tag wurde die Differenzierung gestartet (Tag 0 der Differenzierung). Die Zusammensetzungen des Anzuchtmediums und der Differenzierungsmedien sind im Punkt 2.1.6. aufgeführt. An Tag 3 und Tag 6 erfolgte ein Mediumwechsel. An Tag 7 wurde ein Wechsel des Mediums auf Differenzierungsmedium II durchgeführt. Eine mikroskopische Kontrolle und Beurteilung der Lipidtropfen nach abgeschlossener Differenzierung der Fibroblasten zu reifen Adipozyten sicherte die Qualität der Zellen.

Am Tag 8 wurden die differenzierten Zellen zunächst auf ein serumfreies Medium umgesetzt und anschließend mit den jeweiligen Substanzen stimuliert. Die Gallensäuren wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen und jeweils in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Nach der vorhergesehenen Stimulationszeit wurden sowohl die Zellen als auch der Überstand wurden geerntet.

Die Zellen könnten auch länger bis zu 21 Tagen differenziert werden.

Der Zellphänotyp wurde durch Lichtmikroskopie anhand des Umfangs der Lipidtröpfchen-Ansammlung kontrolliert

2.2.5 RNA-Isolierung

Um die Genexpression, sowie durch Stimulation veränderte Genexpression zu analysieren, wurde zunächst die RNA isoliert werden. Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgte mit den *RNeasy® Mini Kits* von Qiagen. Um eine Hydrolyse der RNA durch überall vorkommende RNasen zu verhindern, wurden spezielle

Schutzmaßnahmen ergriffen (Verwendung von sterilen Filterpipettenspitzen und RNase-freien Reaktionsgefäßen und Lösungen).

Zunächst wurde der Zellüberstand in Eppendorfgefäße überführt und dieser zentrifugiert. Die verbleibenden Zellen wurden in 350 µl Lysepuffer (RLT + 1% β-ME 1:100) gelöst und in Säulen (sog. QIAshredder) aufgetragen und für 2 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Empfehlungen des Herstellers. Es folgten mehrere Waschschrte mit eines vom Hersteller zur Verfügung gestellten Waschpuffers, anschließend konnte die RNA mit 40 µl Nuklease-freiem Wasser von der Säule eluiert werden.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei –80°C.

Bestimmung der Zell-Vitalität

Eine zytotoxische Wirkung der den Zellen zugefügten Substanzen ist möglich, weshalb die LDH-Aktivität im Zellüberstand genauer untersucht wurde. Die Lactat-Dehydrogenase befindet sich im Zellplasma und wird bei einer Zellapoptose oder –lyse freigesetzt. Die LDH-Aktivität ist somit ein Indiz für die Anzahl der abgestorbenen Zellen.

Zur Messung wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche verwendet.

Der Nachweis basiert auf einer kolorimetrischen Messung und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Der Kulturüberstand wird mit serumfreiem Kulturmedium 1:1 verdünnt und mit dem Reaktionsgemisch aus dem Kit für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die LDH-Aktivität wird in einem enzymatischen Test bestimmt: Im ersten Schritt wird NAD⁺ durch die LDH-katalysierte Umwandlung von Lactat zu Pyruvat zu NADH / H⁺ reduziert. Im zweiten Schritt überträgt der Katalysator (Diaphorase) H / H⁺ von NADH / H⁺ auf das Tetrazolium (gelber Farbstoff), das zu Formazan (roter Farbstoff) reduziert wird. Frisches Kulturmedium diente dabei als Negativkontrolle, sodass über einen Vergleich mit dieser die Zellvitalität der Probenüberstände photometrische (Messung bei 490 nm) bestimmt werden konnte.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationen wurden mit *Biotek Epoch Take 3* bestimmt. Es wurden jeweils 2 µl Probe verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte UV-photometrisch gegen dH₂O.

Die Konzentration von RNA wurde über die Messung der Extinktion bei 260 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt.

$$c_{\text{RNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{RNA}} \cdot V$$

c_{RNA} : Konzentration an RNA in der Lösung (µg/ml)

E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm

ϵ_{RNA} : Extinktionskoeffizient von RNA (40 µg/ml)

V : Verdünnungsfaktor, hier 1

cDNA-Synthese

Zur Analyse der Gentranskription kann die vorhandene Menge der mRNA quantifiziert werden. Da bei der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion jedoch eine Polymerase verwendet wird, mit der sich nur DNA amplifizieren lässt, muss zunächst eine *complementary*-DNA (cDNA) der extrahierten mRNA erstellt werden. Die Erstellung eines DNA-Abbildes wird durch das Enzym reverse Transkriptase ermöglicht. Für die Umschreibung der aufgereinigten Gesamt-RNA in cDNA wurden je nach extrahierter RNA-Menge jeweils 150 bis 175 bzw. 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Es wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen benutzt.

2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression wurde mittels qPCR durchgeführt. Diese beruht auf ausgesandten Fluoreszenzsignalen, deren Intensität proportional zur im Ansatz vorhandenen Menge an Doppelstränge ist. Sie erfolgte mit Hilfe des iTaq Universal SYBR Green Supermix und CFX Connect RT-PCR-System (Bio-Rad, München, Deutschland).

Die verwendeten Primer wurden alle von metabion bezogen. Es wurden stets dreifache Werte gemessen.

Zur Quantifizierung wurde die Standardkurvenmethode verwendet. Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, diente als endogene Kontrolle die mRNA-Expressionslevel eines Housekeeping-Gens (GAPDH). Es wurde eine

Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. ΔCt wurde berechnet und auch zwischen den Gruppen im Vergleich zur relativen Kontrollgruppe bestimmt. Abhängig von der Basensequenz hat jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur.

Bei der qTR-PCR werden während jedem Zyklus die vorhandenen DNA-Mengen quantifiziert. Im Ansatz ist ein Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green enthalten, der aufgrund der Proportionalität zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität zur Menge an gebildetem PCR-Produkt die Konzentrationsbestimmung ermöglicht. SYBR Green I fluoresziert nur, wenn er in doppelsträngiger DNA interkaliert. Sobald die DNA-Menge steigt, steigt gleichzeitig die Fluoreszenz proportional an. Bei einer großen Ausgangsmenge an cDNA (und somit mRNA) kann die Fluoreszenz (und somit DNA-Menge) früher detektiert werden.^{152,153}

Für die quantitative Real-Time-PCR wurden pro Ansatz 5 μl SYBR Green Taq Ready Mix mit 1 μl des Forward- und Reverse-Primers zusammenpipettiert und in ein Loch der PCR-Platte vorgelegt. Im Anschluss wurden 4 μl der cDNA hinzugegeben. Auf Grund der mengenmäßigen Überlegenheit der ribosomalen RNA wurde die cDNA vorab etwa 1: 5 verdünnt. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

Die Quantitative Real-Time-PCR erfolgte nach einem dreistufigen Protokoll mit einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Homogenität amplifizierter PCR-Produkte.

Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes:

SYRB Green Supermix 5 μl

MgCl₂, 25 mM x μl

universe Primer, 5 pmol/ μl 1 μl

reverse Primer, 5 pmol/ μl 1 μl

cDNA 4 μl

ddH₂O 18 μl

Verwendete Primerpaare

Die verwendeten Primerpaare sind unter dem Punkt 3.2.1.7. aufgeführt.

2.2.7 Glycerol Assay

Zur Quantifizierung der Lipolyse wurden die freien Glycerinkonzentrationen im Überstand der verschiedenen Proben und der Kontrollgruppe mit Hilfe des *BioVision Glycerin Assay Kit* gemessen. Das Assay misst das aus 3T3-L1-Zellen freigesetzte Glycerin nach Induktion der Lipolyse unter Verwendung der kolorimetrischen Methode. Die Berechnung basierte auf einer im Kit beigefügten standardisierten Lösung. Im Assay wird Glycerin enzymatisch oxidiert, um ein Produkt zu erzeugen, das mit der Sonde zu Farbe (= 570 nm) reagiert.

In die Kavitäten einer 96-Loch Mikrotiterplatte wurden 25 µl der Probe bzw. des Standards pipettiert und 25 µl des *Reaction Mix* (Fa. Biovision) hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Die Farbintensität ist direkt proportional zur Glycerinmenge. Durch bekannte Glycerol-Konzentrationen in der standardisierten Kontrollgruppe konnte eine Standardkurve bestimmt werden und die Glycerol-Konzentrationen berechnet.

Die Messung einer Probe erfolgte jeweils doppelt.

2.2.8 Statistische Analyse

Zur Berechnung von Mittelwerten \pm Standardabweichung (\pm SD) oder \pm Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) wurde das Statistikprogramm SPSS 22.0 verwendet. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Proben wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test verglichen, der Kruskal-Wallis- H-Test wurde für k unabhängige Proben verwendet. Für die Untergruppenanalyse der Mittelwerte wurde Bonferroni's Korrektur durchgeführt, die Korrelationsanalyse mit Hilfe des Spearman-Rho-Tests für lineare Variablen. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. In den Abbildungen zeigen die Kreise die Mittelwerte an und die Whiskers das 95%-Konfidenzintervall (CI) des Mittelwertes.

3 Ergebnisse

3.2 In vivo

3.2.1 Demographische und klinische Daten

<i>Studienpopulation</i>	(n = 100)
Alter (Jahre)	28.1 ± 7.7 [18–54]
Männlich	n (%) 42 (42)
Weiblich	n (%) 58 (58)
<i>Anthropometrische Parameter</i>	
Mittlerer BMI (kg/m ²)	24.2 ± 5.0 [14.8–46.1]
BMI < 25 kg/m ²	66 (66%)
BMI > 25 kg/m ²	34 (34%)
Taillenumfang (cm)	83.9 ± 13.0 [63.0–122.0]
Hüftumfang (cm)	99.5 ± 10.1 [77.0–131.0]
Taillen-Hüft-Verhältnis	0.84 ± 0.09 [0.68–1.07]
Hautfaltendicke (mm)	11.3 ± 8.9 [1.0–47.0]
<i>Kreislauf</i>	
Systolischer Blutdruck (mm Hg)	121 ± 15 [90–174]
Diastolischer Blutdruck (mm Hg)	78 ± 9 [60–105]
Herzfrequenz (min ⁻¹)	73 ± 12 [50–105]
<i>Kohlenhydrat-Stoffwechsel</i>	
Plasmaglukose 0h (mg/dl)	74 ± 13 [40–110]
Plasmainsulin 0h (mU/l)	8.9 ± 5.7 [2.3 – 33.3]
Plasma C-peptid 0h (µg/l)	1.3 ± 0.5 [0.5–3.8]
<i>Lipid-Stoffwechsel</i>	
Gesamtcholesterin 0h (mg/dl)	191 ± 39 [52–297]
Triglyceride 0h (mg/dl)	120 + 50 [24–299]
LDL Cholesterin 0h (mg/dl)	111 ± 33 [21–196]
HDL Cholesterin 0h (mg/dl)	60 ± 17 [23–107]

<i>Inflammation</i>	
CRP (mg/l)	3.9 ± 3.2 [2.9–27]

Tabelle 4: Klinische und demographische Daten: Die Tabelle fasst die detaillierten Daten der Studienpopulation zusammen. Es wurden anthropometrische Parameter, Kreislaufparameter, Stoffwechselwerte, sowie der CRP-Wert als Inflammationsmarker erfasst. Die Daten werden als Mittel ± SD (Standardabweichung) und Bereiche (eckige Klammern) dargestellt. Demographische Daten der vorliegenden Studienkohorte und die hier gezeigte Tabelle wurden bereits früher in Subkohorten ^{143,144} untersucht und aktuell hinsichtlich der hier erhobenen Daten publiziert. ¹⁵⁴, S.4 Tabelle1.

3.2.2 Gallensäurenprofile während des OLTT

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die wichtigsten Gallensäurespezies und ihre systemische Reaktion im Serum im Verlauf während des OLTT. Alle Hauptgallensäurearten, totale/freie Gallensäuren, Primär-/Sekundärgallensäuren und Taurin-/Glycin-konjugierte Gallensäuren zeigen signifikante Veränderungen während des OLTT.

	OLTT 0h	OLTT 2h	OLTT 4h	OLTT 6h	p-Wert Kruskal- Wallis-H test
Gesamt GS	3308.720 ± 392.252	9947.405 ± 823.842**	7919.28 ± 795.655**	5516.245 ± 471.777**	p<0.001
Freie GS	1321.010 ± 235.997	1219.923 ± 171.397	745.489 ± 81.044	648.024 ± 77.715*	p<0.001
Primäre GS	1989.724 ± 285.873	6266.021 ± 544.104**	4767.497 ± 471.335**	3281.506 ± 295.014**	p<0.001
Sekundäre GS	1318.995 ± 125.796	3681.389 ± 334.222**	3151.780 ± 348.645**	2234.746 ± 200.073**	p<0.001
Taurin- konjugierte GS	360.374 ± 41.359	1796.152 ± 227.605**	1573.599 ± 284.211**	1023.587 ± 169.335**	p<0.001
Glycin- konjugierte GS	1627.333 ± 191.093	6931.332 ± 608.544**	5600.190 ± 564.251**	3844.633 ± 341.230**	p<0.001

Tabelle 5: Gallensäureprofile während des OLTT: Die Daten werden als mittlere Konzentrationen ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) in nmol/l angegeben. Für die Gesamtkorrelationsanalyse der Daten ist der nichtparametrische Kruskal- Wallis-H-Test angewandt. Für den direkten Vergleich der mittleren Gallensäurewerte von 0h bis 2h, 4h bzw. 6h ist der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test verwendet worden (* p = 0,001; ** p<0,001). Da 4 Untergruppen (Zeitpunkte) verglichen wurden, wird die Signifikanz durch die Bonferroni-Korrektur bei einem p-Wert < 0,0125 erreicht. Diese Daten wurden unlängst publiziert. ¹⁵⁴, S.5 Tabelle 2.

Die gesamten Gallensäuren steigen auf einen 3fachen Wert mit einem Maximum bei 2h an und blieben auch zu den Messpunkten bei 4h und 6h im Vergleich zum Fastenzustand erhöht. Im Gegensatz dazu reduzieren sich die freien Gallensäuren 6h nach OLTT signifikant um etwa 50%.¹⁵⁴

Sowohl die primären als auch die sekundären Gallensäure-Spezies erhöhen sich deutlich auf das 3-fache mit einem Maximum bei 2h und bleiben auch auf einem höheren Niveau im Vergleich zum 0h-Zeitpunkt. Auch die Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensäuren erhöhen sich deutlich auf das 4 bis 5-fache mit einem Maximum bei 2h und blieb auch auf einem höheren Plateau.¹⁵⁴

Gallen-säuren-spezies	OLTT 0h	OLTT 2h	OLTT 4h	OLTT 6h	p-Value Kruskal- Wallis test
<u>Primäre Gallensäuren</u>					
<u>Nicht-konjugiert</u>					
CA	873.479 ± 204.050	898.947 ± 424.138	465.679 ± 148.421	481.794 ± 177.428	0.2542
CDCA	569.232 ± 132.654	453.927 ± 72.115	258.656 ± 45.992 *	261.614 ± 50.172	0.001
<u>Taurin-konjugiert</u>					
TCDCA	188.461 ± 20.865	922.491 ± 104.140 **	787.482 ± 114.169 **	531.767 ± 74.298 **	<0.001
TCA	69.491 ± 11.138	353.543 ± 58.511 **	291.204 ± 66.445 **	192.564 ± 41.567 **	<0.001
<u>Glycin-konjugiert</u>					
GCDCA	741.949 ± 92.486	3099.537 ± 273.912 **	2474.421 ± 238.492 **	1672.319 ± 138.267 **	<0.001
GCA	321.045 ± 52.853	1370.278 ± 140.969 **	995.840 ± 111.553 **	712.917 ± 85.597 **	<0.001
<u>Sekundäre Gallensäuren</u>					
<u>Nicht-konjugiert</u>					
DCA	403.422 ± 36.961	534.504 ± 54.941	400.323 ± 40.126	341.823 ± 30.930	0.065
HDCA	51.293 ± 11.781	50.838 ± 4.923	42.022 ± 4.159	36.430 ± 3.067	0.088
LCA	142.273 ± 53.182	128.878 ± 18.523*	103.149 ± 17.075	82.148 ± 11.409	0.004

<u>Taurin-</u>					
<u>konjugiert</u>					
TDCA	80.859 ± 11.849	428.328 ± 71.909 **	412.929 ± 103.339 **	241.241 ± 54.809 **	<0.001
THDCA	5.040 ± 0.893	22.608 ± 4.483 **	21.426 ± 4.720 **	13.582 ± 2.259 **	<0.001
TLCA	7.595 ± 1.339	34.069 ± 6.728**	32.182 ± 7.081 **	20.204 ± 3.360 **	<0.001
<u>Glycin-</u>					
<u>konjugiert</u>					
GDCA	353.597 ± 46.483	1438.036 ± 145.168 **	1193.556 ± 143.518 **	787.910 ± 85.000 **	<0.001
GHDCA	126.382 ± 17.910	378.963 ± 61.405 **	356.581 ± 63.921 **	268.137 ± 38.275 **	<0.001
GLCA	162.795 ± 25.813	521.973 ± 87.772 **	489.985 ± 91.349 **	363.635 ± 54.707 **	<0.001
<u>Tertiäre Gallensäuren</u>					
<u>Nicht-konjugiert</u>					
UDCA	142.273 ± 53.182	128.878 ± 18.523	103.149 ± 17.075	82.148 ± 11.409	0.195
<u>Taurin-</u>					
<u>konjugiert</u>					
TUDCA	7.595 ± 1.339	34.069 ± 6.728**	32.182 ± 7.081 **	20.204 ± 3.360 **	<0.001
<u>Glycin-</u>					
<u>konjugiert</u>					
GUDCA	162.795 ± 25.813	521.973 ± 87.772 **	489.985 ± 91.349 **	363.635 ± 54.707 **	<0.001

Tabelle 6: *Gallensäureprofile während des OLTT im Detail.* Die Daten werden als mittlere Konzentrationen ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) in nmol/l angegeben. Für die Gesamtkorrelationsanalyse der Daten wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-H-Test angewandt. Für den direkten Vergleich der mittleren Gallensäurewerte von 0h bis 2h, 4h bzw. 6h ist der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test verwendet worden (* p<0,01; ** p<0,001). Da 4 Untergruppen (Zeitpunkte) verglichen wurden, wird die Signifikanz bei einem p-Wert < 0,0125 durch Bonferroni's Korrektur erreicht. Diese Daten wurden unlängst publiziert. ¹⁵⁴, S.6 Tabelle 3.

Primäre Gallensäuren: CA, Cholsäure; CDCA, Chenodesoxycholsäure;
Sekundäre Gallensäuren: DCA, Desoxycholsäure; HDCA, Hyodesoxycholsäure;
LCA, Lithocholsäure;
Tertiäre Gallensäuren: UDCA, Ursodesoxycholsäure;
Taurin-konjugierte Gallensäuren: TCA, Taurocholsäure;
TCDCA, Taurochenodesoxycholsäure;
TDCA, Taurodesoxycholsäure;
TLCA, Tauroolithocholsäure;

TUDCA, Tauroursodesoxycholsäure;
THDCA, Taurohyodesoxycholsäure;
 Glycin-konjugierte Gallensäuren: *GCA, Glycocholsäure;*
GCDCA, Glycochenodesoxycholsäure;
GDCA, Glycodesoxycholsäure;
GLCA, Glycolithocholsäure;
GUDCA, Glycoursodesoxycholsäure;
GHDCA, Glykohyodesoxycholsäure.

Im Vergleich zu den gesamten Gallensäuren und den Taurin-konjugierten Gallensäuren, die ihr Maximum bei 2h erreichen und bei 4h und 6h wieder abfallen, steigen die Serum-Triglyzeride bei 2h auch wie zu erwarten an, erreichen bei 4h jedoch ein Plateau, bevor die Triglyzerid-Levels wieder rückläufig sind.^{143,154}

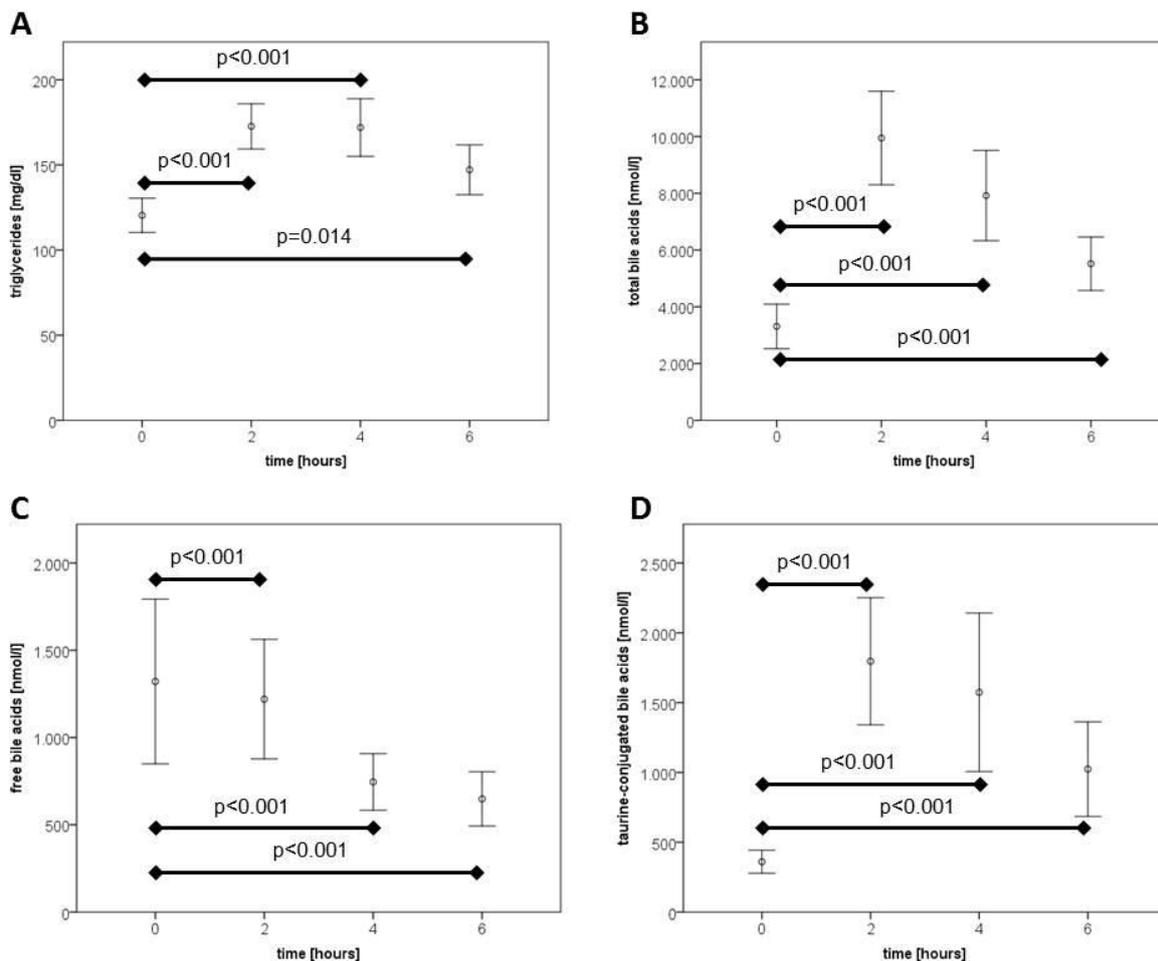


Abbildung 11: Serumtriglyzerid- und Gallensäurewerte während des OLTT (0, 2, 4, 6h). Es werden zusätzlich freie und Taurin-konjugierte Gallensäuren differenziert. Die Daten werden als mittlere Konzentrationen + SEM (Standardfehler des Mittelwertes) in nmol/l angegeben. Die mittleren Gallensäurewerte bei 2, 4 und 6h wurden mit den Fastenwerten

mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test verglichen. Die 4 Untergruppen (Zeitpunkte) wurden gemäß der Bonferroni's Korrektur verglichen. Unterschiede werden als bei einem p-Wert $< 0,0125$ statistisch signifikant anerkannt. Die Ergebnisse der Abbildung A wurden unlängst veröffentlicht.¹⁴³ Die übrigen Abbildungen der Abb. 11 wurden als Poster auf der DACH-Tagung 2016 in München vorgestellt.

Da die Veränderungen der Hauptgallensäurespezies keinen tieferen Einblick in die Physiologie der Gallensäuren und mögliche endokrine Effekte von zirkulierenden einzelnen/spezifischen Gallensäuren nach oraler Lipidaufnahme erlauben, wurden 18 verschiedene Spezies zu allen vier Zeitpunkten (0h, 2h, 4h, 6h) von allen 100 Studienteilnehmern während des OLTT quantifiziert. Tabelle 6 fasst die einzelnen Veränderungen der 18 Gallensäuren während des OLTT zusammen.

Taurin-konjugierte Gallensäuren: Alle 6 Taurin-konjugierten Gallensäuren (TUDCA, THDCA), TCA, TCDCA, TDCA, TLCA) stiegen signifikant auf das 5 fache und früh (nach 2h) und blieben bis zum Ende des OLTT auf erhöhtem Niveau.

Glycin-konjugierte Gallensäuren: Auch alle 6 Glycin-konjugierten Gallensäuren (GUDCA, GHDCa, GCA, GCDCA, GDCA, GLCA) stiegen signifikant (~3 bis 4-fach) und früh (nach 2h) und verblieben auf erhöhtem Niveau bis zum Ende des OLTT.

Primäre Gallensäuren: Von den beiden primären Gallensäuren (CA und CDCA) blieb CA unverändert, während CDCA signifikant bei 4h zurückging.

Sekundäre Gallensäuren: Von den sekundären Gallensäuren änderten sich DCA und HDCA nicht signifikant. LCA nahm während des OLTT schrittweise ab, eine Signifikanz zeigte sich jedoch nur zum Zeitpunkt 2h im Vergleich zu 0h.

Tertiäre Gallensäuren: Von den tertiären Gallensäuren änderte sich UDCA nicht signifikant.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der gesamten Gallensäuren, Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensäuren sowie CDCA.

Es gab eine marginale, physiologische irrelevante Korrelation zwischen dem Alter und der Konzentration der freien Gallensäure ($p = 0,049$; $r = -0,200$).

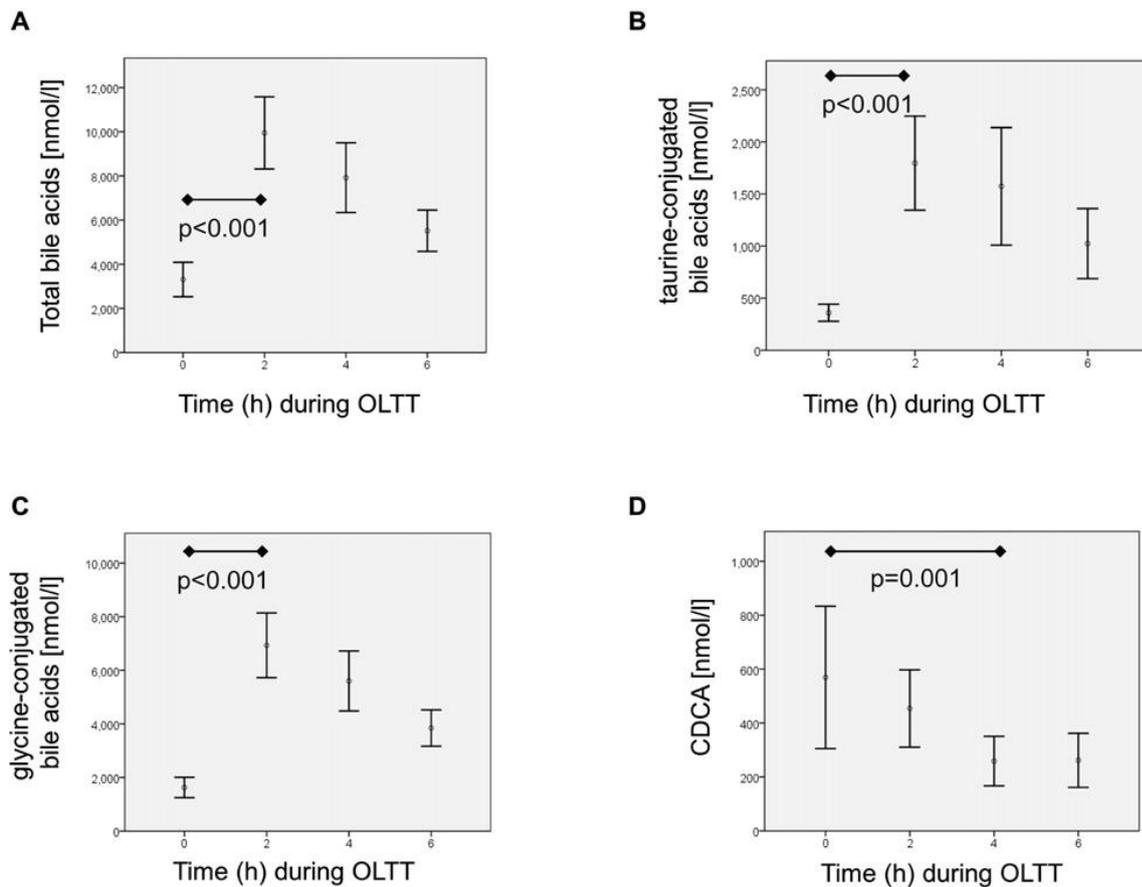


Abbildung 12: Zeitabhängige Variationen von Gallensäuren während eines oralen Lipidtoleranztests (OLTT) bei gesunden Personen ($n = 100$) für die Gesamtgallensäure (A), Taurin-konjugierte Gallensäuren (B), Glycin-konjugierte Gallensäuren (C) und Chenodesoxycholsäure (D). Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Whisker geben das 95% Konfidenzintervall (CI) des Mittelwertes an. CDCA, Chenodesoxycholsäure. Diese Daten wurden unlängst publiziert. ¹⁵⁴, S.7 Figur 1.

3.2.3 Korrelationen von FGF-19 und FGF-21

In der Tabelle werden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der postprandialen FGF-19-Konzentrationen mit den Gallensäure-Arten zusammengefasst. In der vorangegangenen Arbeit ¹⁴⁴ konnte ein signifikanter ($p = 0,006$) Anstieg der Triglyzeride zwischen 2h und 4h und einen signifikanten Anstieg von FGF-19 bei 4h während des OLTT in dieser Kohorte gezeigt werden. Die basalen FGF-19-Werte lagen bei 105 ± 81 pg/ml und stiegen bis auf 141 ± 102 pg/ml ($p = 0,006$) bei 4 h. Im Vergleich dazu ist der maximale Anstieg der Gallensäuren schon zu einem frühen Zeitpunkt bei 2h während des

OLTT zu beobachten und eine Verzögerung von 1-2h zwischen dem postprandialen Anstieg der Gallensäuren und FGF-19. Diese Beobachtung lässt sich mit den Angaben in der Literatur vereinbaren ^{142,155}.

Jedoch konnte hier die Kinetik für einen reinen Lipidtoleranztest frei von Kohlenhydraten und Proteinen noch nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie konnten wir signifikante positive Korrelationen zwischen den FGF-19-Werten und den Gallensäuren zeigen. Der auffälligste Zusammenhang zeigte sich bei 6h nach der Lipidaufnahme. In Bezug auf die Hauptgallensäure-Spezies gab es eine hochsignifikante und positive Korrelation zwischen FGF-19-Spiegel und den Gesamtgallensäuren, freien Gallensäuren, primären Gallensäuren, sekundäre Gallensäuren, Taurin-konjugierten Gallensäuren und Glycin-konjugierten Gallensäuren. Da es unser Ziel war, die Gallensäuren zu identifizieren, die hauptsächlich für diese Klasseneffekte verantwortlich sind, wurde eine Korrelationsanalyse für jede der 18 gemessenen Gallensäuren durchgeführt.

Für GUDCA, UDCA, GHCA, HDCA, CA, CDCA, GLCA und LCA wurden keine signifikanten Korrelationen gefunden. Die positive Korrelation zwischen FGF-19 und Gallensäuren war für die Taurin-konjugierten Gallensäuren am stärksten ($r = +0,8$). Alle sechs Taurin-konjugierten Gallensäuren TUDCA, THCA, TCA, TCDCA, TDCA und TLCA zeigten eine positive Korrelation mit FGF-19. Die Korrelation zwischen FGF-19 und den Glycin-konjugierten Gallensäuren zeigte sich nur bei GCA, GDCA und GCDCA, GUDCA, GHCA und GLCA hingegen nicht.

In der vorherigen Studie wurde des Weiteren auch gezeigt, dass der FGF-21-Spiegel signifikant während des OLTT abnimmt. ¹⁴³ Die basalen FGF-21-Konzentrationen zeigten Werte von $158,8 \pm 203,6$ pg/ml bei 0h bis $127,6 + 184,4$ pg/ml bei 2h ($p = 0,03$). Im Gegensatz zu FGF-19 war FGF-21 mit einigen der Gallensäuren negativ korreliert. Im Einzelnen korrelierten die FGF-21-Konzentrationen bei 6h signifikant und negativ mit Taurin-konjugierten Gallensäuren im Gesamten ($p = 0,017$; $r = -0,24$) und mit TCA ($p = 0,002$; $r = -0,3$), TDCA ($p = 0,014$; $r = -0,25$) und TLCA ($p = 0,04$; $r = -0,21$).

Auch diese Ergebnisse wurden bereits publiziert. ¹⁵⁴

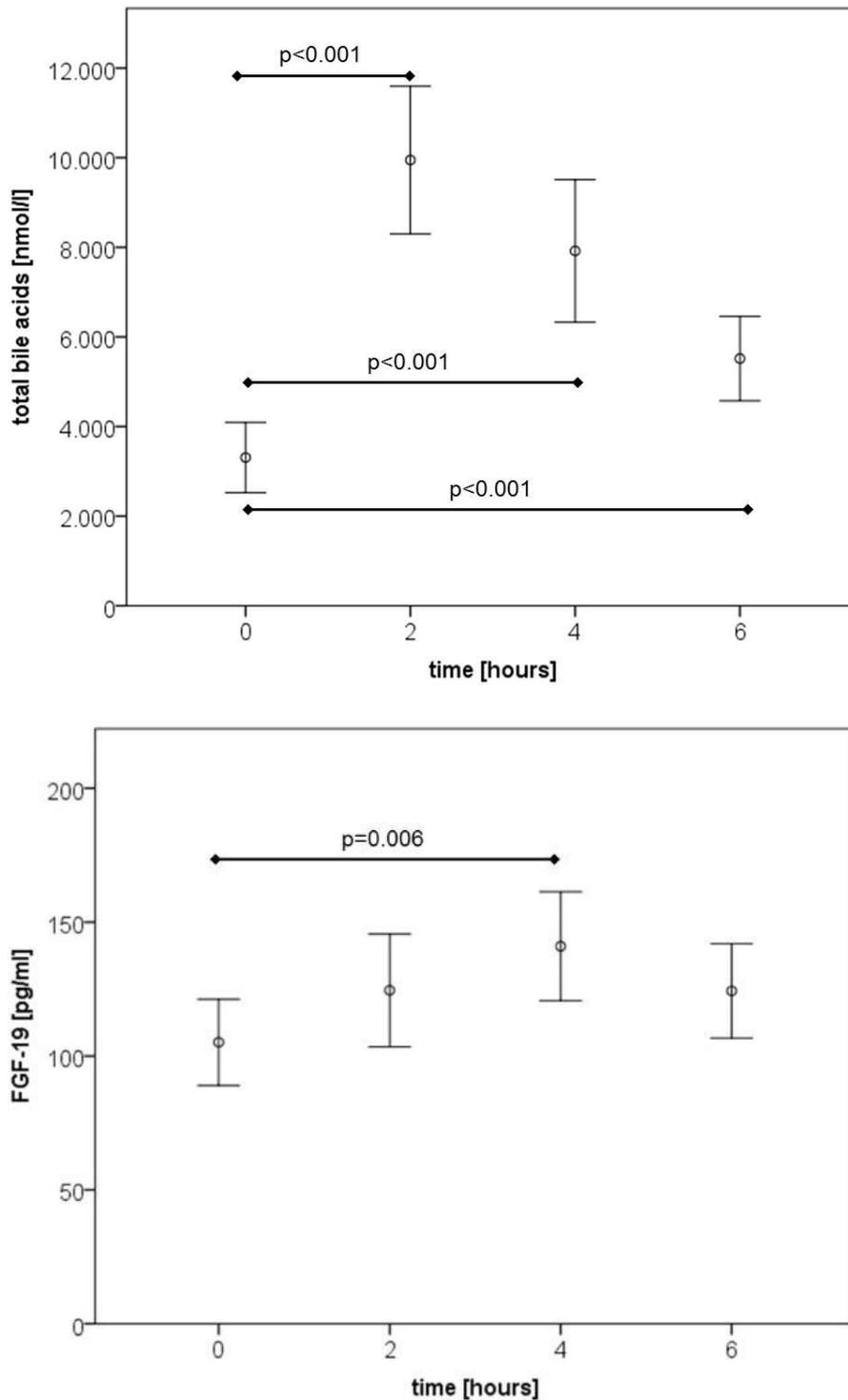


Abbildung 13: Postprandialer Verlauf von Serum-Gesamtgallensäure und Serum FGF-19 (pg/ml) während des OLTT. Nach 2 Stunden wird ein maximaler Wert der Gesamtgallensäuren gemessen. Nach 6 Stunden sind sie abgefallen, erreichen jedoch noch nicht wieder den Ausgangswert. FGF-19 erreicht im Serum erst nach 4 Stunden den maximalen Wert. Der Verlauf von FGF-19 während des OLTT wurde bereits publiziert.

¹⁴⁴, S. 92 Figur 1.

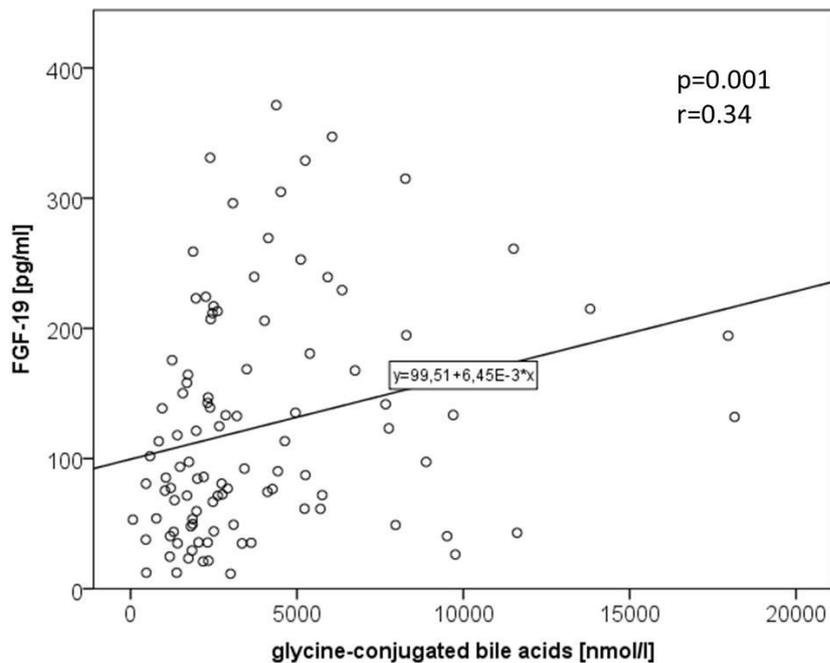
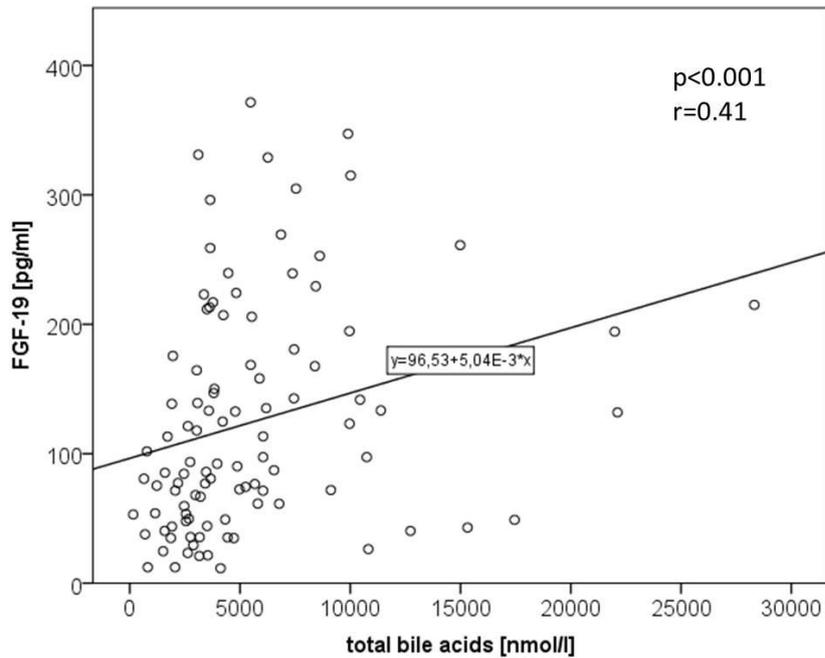


Abbildung 14: Korrelationsanalyse der Serum-FGF-19-Spiegel mit Gesamt- und Glycin-konjugierten Gallensäuren 6h nach oraler Lipidaufnahme mittels Spearman-Rho-Test. Diese Abbildungen wurden als Poster auf der DACH-Tagung 2016 in München gezeigt.

	<i>Gallensäurenspezies</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Korrelationskoeffizient r</i>
<i>FGF-19</i>	GS gesamt	<0.001	+ 0.41
<i>FGF-19</i>	Freie GS	0.012	+ 0.25
<i>FGF-19</i>	Primäre GS	0.001	+ 0.34
<i>FGF-19</i>	Sekundäre GS	<0.001	+ 0.7
<i>FGF-19</i>	Taurin-konjugierte GS	<0.001	+ 0.8
<i>FGF-19</i>	Glycin-konjugierte GS	0.001	+ 0.34
<i>FGF-19</i>	TUDCA	0.012	+ 0.25
<i>FGF-19</i>	THDCA	0.012	+ 0.25
<i>FGF-19</i>	TCA	0.024	+ 0.23
<i>FGF-19</i>	GCA	0.026	+ 0.23
<i>FGF-19</i>	TCDCa	0.002	+ 0.30
<i>FGF-19</i>	GCDCA	0.002	+ 0.31
<i>FGF-19</i>	TDCA	<0.001	+ 0.4
<i>FGF-19</i>	GDCA	<0.001	+ 0.37
<i>FGF-19</i>	DCA	0.003	+ 0.3
<i>FGF-19</i>	TLCA	0.004	+ 0.29

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt die Korrelation zwischen den FGF-19-Spiegel (pg / ml) und verschiedenen Gallensäurespezies (nmol / ml) 6h nach der oralen Lipidaufnahme ml durch den Spearman-Rho-Test. Für die Gallensäuren GUDCA, UDCA, GHDCA, HDCA, CA, CDCA, GLCA und LCA waren die Korrelationen nicht signifikant, sodass die Daten in der Tabelle nicht aufgeführt werden. Der BMI war nicht signifikant mit dem FGF-19-Spiegel korreliert. Diese Tabelle wurde bereits publiziert. ¹⁵⁴, S.8, Tabelle 4.

3.2.4 Einfluss von Geschlecht, BMI und hormoneller Kontrazeption

Die Untergruppenanalyse zeigte differentielle Effekte des Geschlechts auf den postprandialen Gallensäurespiegel bei 6h nach OLTT. Die Tabelle 8 fasst diese Auswirkungen des Geschlechts zusammen. Taurin-konjugierte Gallensäuren im Allgemeinen waren bei Frauen signifikant um das 2,5-fache höher als bei Männern. Dies wird auch in Abbildung 15 veranschaulicht. Im Einzelnen waren alle Taurin-konjugierten Gallensäurespezies bei Frauen im Vergleich zu Männern signifikant höher (1,5 bis 3-fach).

Da sich das gesamte Gallensäurenniveau von Männern und Frauen nicht signifikant voneinander unterschied, sind diese Unterschiede nicht auf das Geschlecht zurückzuführen - möglicherweise jedoch auf Unterschiede in der Empfindlichkeit im Lipidstoffwechsel. Keine der Glycin-konjugierten Gallensäuren war geschlechtsabhängig. UDCA konnte als einzige Gallensäure mit deutlich niedrigeren Werten bei Frauen im Vergleich zu Männern identifiziert werden. Die verbleibenden Gallensäuren unterschieden sich nicht signifikant zwischen weiblichen und männlichen Studienteilnehmern.

Wenn Taurin-konjugierte Gallensäure-Niveaus der Männer jedoch mit denen der Frauen verglichen wurden, die keine hormonelle Kontrazeption verwendeten, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt werden. Daher wurde die Wirkung der hormonellen Kontrazeption genauer betrachtet: Anwender von hormoneller Verhütung zeigten unterschiedliche Effekte bezüglich ihrer postprandialen Galle. Die Gallensäurespiegel bei 6h nach OLTT sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Taurin-konjugierte Gallensäuren waren bei den Anwenderinnen einer hormonellen Kontrazeption 3-fach höher im Vergleich zu Nicht-Nutzerinnen. Dieser Zusammenhang wird auch in Abbildung 16 dargestellt. Alle Taurin-konjugierten Gallensäurespezies waren hierbei betroffen. Da die Taurin-konjugierten Gallensäuren sich auch zu Studienbeginn schon etwas höher ($p = 0,026$) bei Nutzerinnen vs. Nicht-Nutzerinnen darstellten ließen, kann dieser Effekt sowohl an den Unterschieden im Gesamtniveaus liegen, als auch an Unterschiede in der Empfindlichkeit im Lipidstoffwechsel. CDCA war die einzige identifizierte Gallensäure, deren Konzentrationen unter hormoneller Verhütung signifikant niedriger waren. Die restlichen Gallensäuren unterschieden sich nicht signifikant zwischen Anwenderinnen und Nicht-Nutzerinnen hormoneller Verhütung.

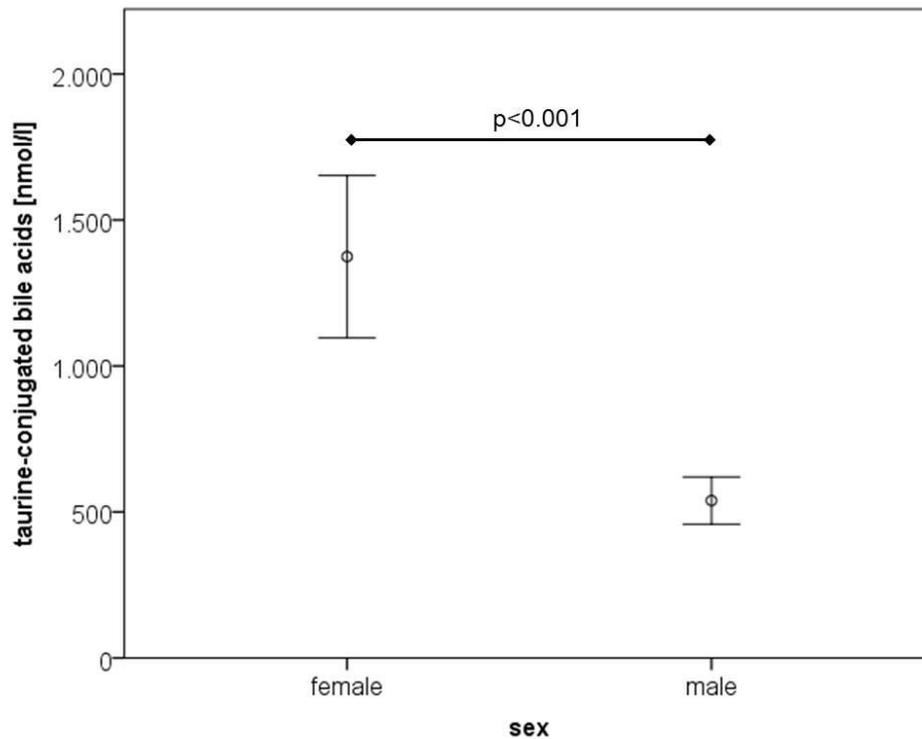


Abbildung 15: Effekte des Geschlechts auf den Serumspiegel von Taurin-konjugierten Gallensäuren (nmol/l) bei 6h nach oraler Lipidaufnahme. Es werden Mittelwerte + SEM angezeigt.

Bei der Unterteilung in Probanden mit einem BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ und übergewichtigen/fettleibigen Probanden (BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) unterschieden sich die Mittelwerte aller gemessenen Gallensäuren nicht signifikant.

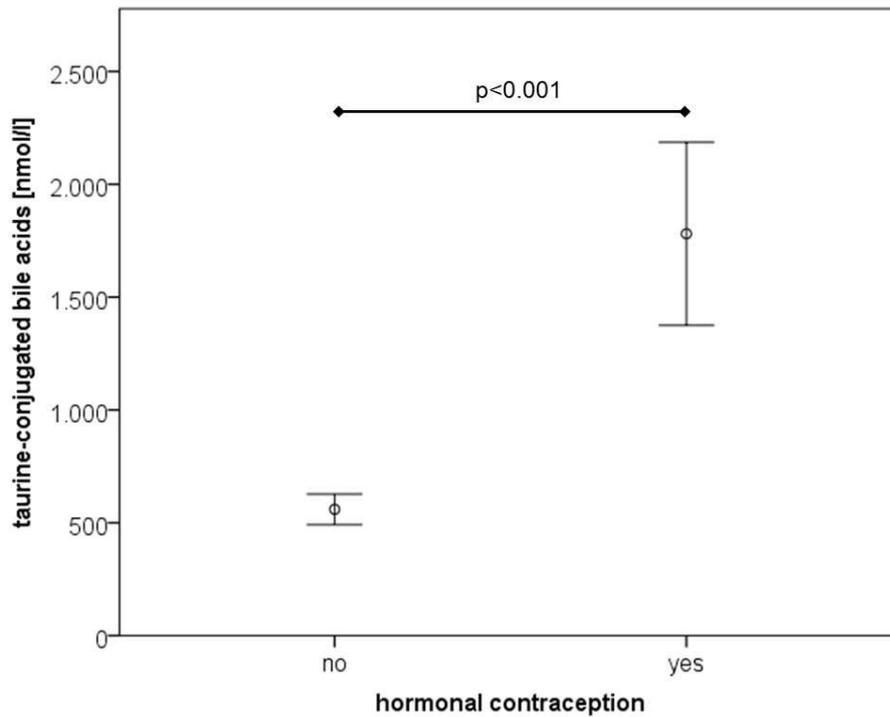


Abbildung 16: Effekte der hormonellen Empfängnisverhütung auf den Serumspiegel von Taurin-konjugierten Gallensäuren (nmol/l) bei 6h nach oraler Lipidaufnahme. Es werden Mittelwerte + SEM angezeigt. In der Gruppe der hormonellen Kontrazeption zeigen sich signifikant höhere Spiegel Taurin-konjugierter Gallensäuren.

	<u>weiblich</u>	<u>männlich</u>	Signifikanz
Gallensäuren	n=58	n=42	p-Wert
Taurin-konjugierte Gallensäuren	1374.403 ± 278.042	539.126 ± 81.016	0.001
TUDCA	23.505 ± 4.527	15.645 ± 4.968	0.023
THDCA	15.923 ± 3.059	10.405 ± 3.312	0.016
TCA	270.666 ± 69.171	84.71 ± 16.072	0.001
TCDC	680.584 ± 119.578	326.257 ± 50.081	0.002
TDCA	351.110 ± 91.460	89.517 ± 15.582	<0.001
TLCA	33.470 ± 5.592	13.562 ± 1.518	0.002
UDCA	69.425 ± 14.178	102.968 ± 18.707	0.028
Gallensäuren	<u>Kontrazeption</u>	<u>Kontrazeption</u>	Signifikanz
	(weiblich)	(weiblich)	
	<u>Ja</u> (n=38)	<u>Nein</u> (n=20)	p-Wert
Taurin-konjugierte Gallensäuren	1780.774 ± 405.625	602.300 ± 126.166	0.001
TUDCA	25.711 ± 3.999	19.315 ± 10.848	0.003
THDCA	17.147 ± 2.667	13.474 ± 7.592	0.005
TCA	356.897 ± 102.082	106.825 ± 30.228	0.003
TCDC	860.032 ± 172.146	33.635 ± 73.599	0.002
CDCA	110.420 ± 34.022	475.008 ± 142.319	0.003
TDCA	480.629 ± 134.704	105.025 ± 27.824	<0.001
TLCA	40.363 ± 7.903	19.684 ± 4.402	0.046

Tabelle 8: Gallensäuren (nmol/l) mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationen zwischen Frauen/Männern und Benutzern/Nicht-Nutzern hormoneller Verhütung bei 6h während der OLTT werden zusammengefasst. Es werden Mittelwerte + SEM angezeigt. Diese Daten wurden unlängst veröffentlicht. ¹⁵⁴, S. 9 Tabelle 5.

3.3 In vitro

Um die Auswirkungen einer Stimulation mit freien Gallensäuren auf inflammatorische Adipokine und Zytokine in den Überständen von Adipozyten zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente in den aus 3T3-L1 Fibroblasten differenzierten Adipozyten durchgeführt.

Die Zellen wurden mit serumfreiem, den jeweiligen Stimulus enthaltendem Medium bedeckt. In getrennten Ansätzen wurden Adipozyten mit Gallensäuren in verschiedenen Konzentrationen für die Dauer von 18 h inkubiert. Die eingesetzten Mengen an Gallensäure wurden in Vorversuchen getestet, damit keine Zell-toxischen Konzentrationen verwendet werden.

Die Experimente analysieren den Effekt von Gallensäuren auf Gene und Proteinexpression von Adipozyten-Differenzierungs-Markern. Die Stimulation mit verschiedenen Gallensäuren hat auf die Genexpression von Adipokinen und Cytokinen und die basale Lipolyserate verschiedene und signifikante Effekte.

In den Ansätzen wurden verschieden Gallensäuren-Klassen verwendet. Im folgenden Abschnitt werden nur die signifikanten Ergebnisse aufgeführt.

3.3.1 Effekte auf die basale Lipolyse

Die wichtigste Funktion der Lipolyse ist die Energiegewinnung. Triglyzeride werden lipolytisch gespalten, dabei entstehen freie Fettsäuren und Glycerin.⁷²

Bisher sind verschiedene Regulatoren der Lipolyse bekannt: Während Katecholamine, TSH und Thyroxin, Wachstumshormone, Glukokortikoide, Parathormon, Cholezystkinin, Prostaglandin PGI₂ und TNF α die Lipolyse stimulieren, haben Insulin, IGF-1, Somatostatin, Adenosin, freie Fettsäuren, Ketonkörper und Laktat einen inhibitorischen Effekt¹⁵⁶.

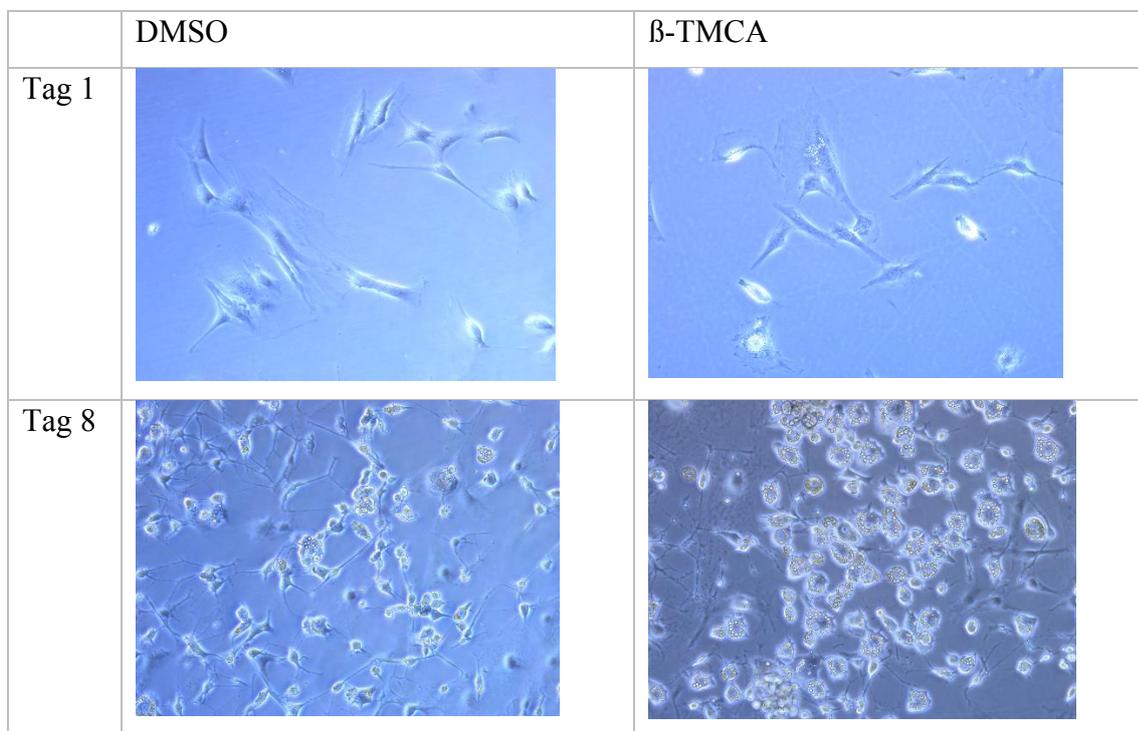


Tabelle 9: *3T3-L1 Fibroblasten während der Adipozytendifferenzierung* unter Behandlung mit DMSO (Kontrolle) oder mit Tauro- β -Muricholsäure (β -TMCA). Die Bilder wurden an den Tagen 1 und 8 der Differenzierung mit Lichtmikroskopie in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurde das Inverse Mikroskop Modell DM IL LED von Leica verwendet.

β -TMCA scheint mikroskopisch die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipocyten zu fördern.

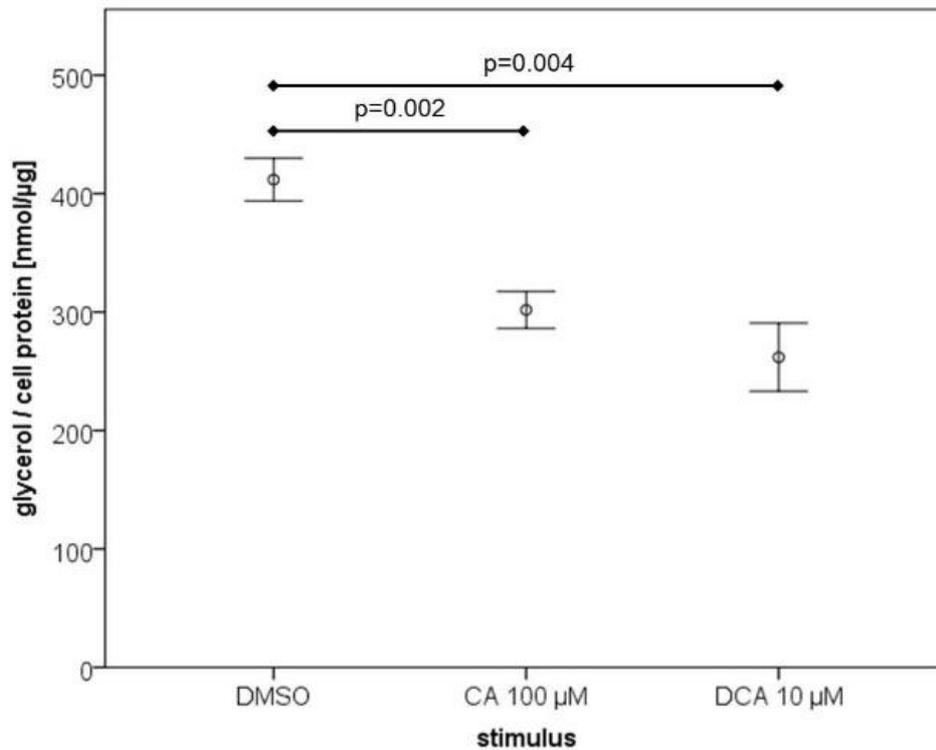


Abbildung 17: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Lipolyse. Es werden Mittelwerte + SEM angezeigt. DMSO Kontrolle; * $p < 0,05$. Die 3T3-L1 Adipozyten wurden mit jeweils 100 µM Cholsäure und 10 µM Desoxycholsäure stimuliert. Als Maß für die Lipolyse wird das freie Glycerin im Überstand gemessen. CA und DCA wirken hemmend auf die basale Lipolyserate.

3.3.2 Effekte auf die Genexpression von CCL2

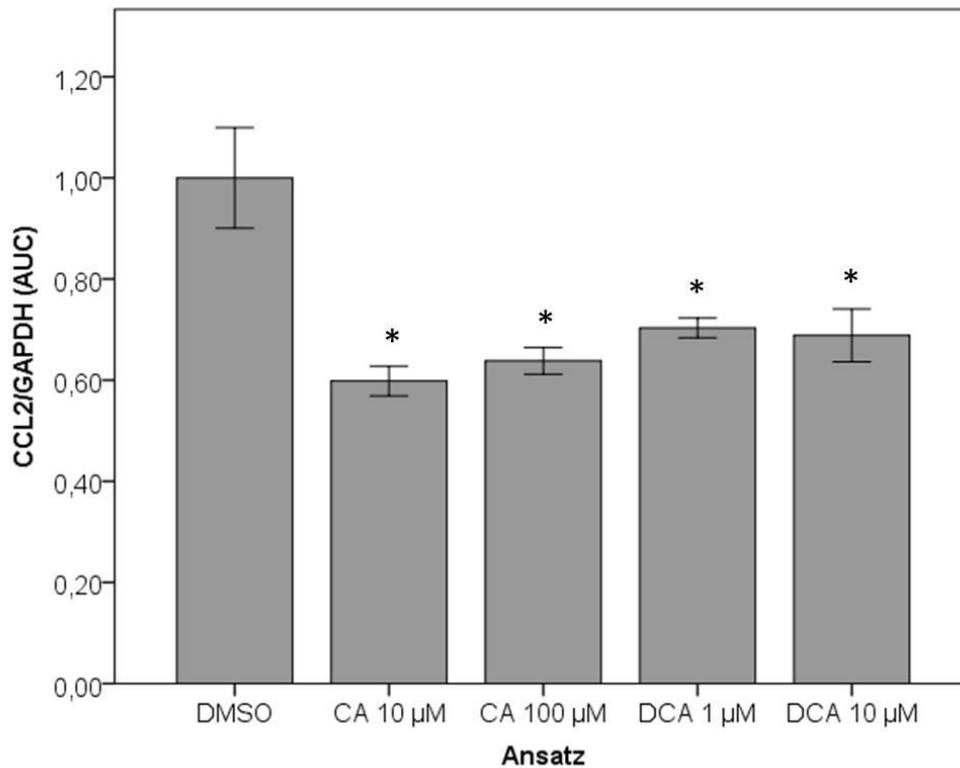


Abbildung 18: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Genexpression von CCL2 nach Applikation von Cholsäure und Desoxycholsäure in verschiedenen Konzentrationen (jeweils 10 µM bzw. 100 µM). Es werden Mittelwerte + SEM angezeigt. DMSO Kontrolle; * $p < 0,05$. Cholsäure und Desoxycholsäure sowohl in niedriger, als auch in hoher Konzentration haben einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von CCL2.

3.3.3 Effekte auf die Genexpression von Leptin

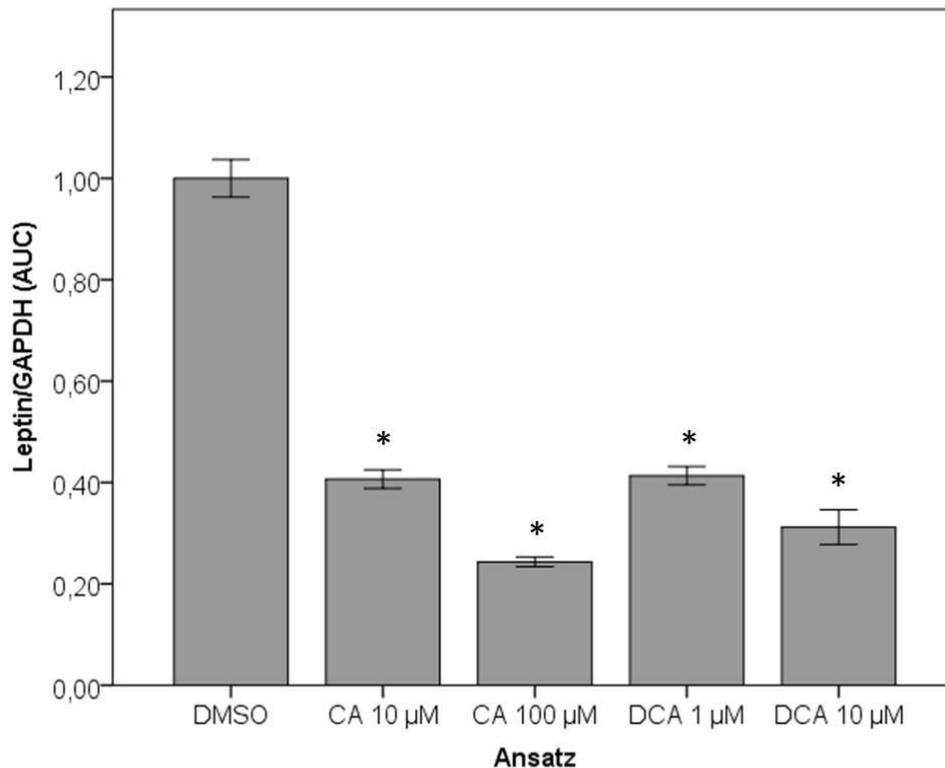


Abbildung 19: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Genexpression von Leptin nach Stimulation mit Cholsäure und Desoxycholsäure in verschiedenen Konzentrationen. Es wurden 10 bzw. 100 µM Cholsäure und 1 bzw. 10 µM Desoxycholsäure appliziert. Es werden Mittelwerte + SEM angezeigt. DMSO Kontrolle; * p<0,05.

Cholsäure und Desoxycholsäure haben einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von Leptin. Leptin hat pro-inflammatorische Eigenschaften und mehrere Aktionen ähnlich denen der akuten Phase Reaktanten und reguliert die Sekretion von entzündlichen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-12.¹¹⁶

In unserem Experiment konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung durch die Stimulation mit den Gallensäuren Cholsäure und Desoxycholsäure unterdrückt wird und die getesteten Gallensäuren eine antiinflammatorische Wirkung haben.

3.3.4 Effekte auf die Genexpression von PPAR γ

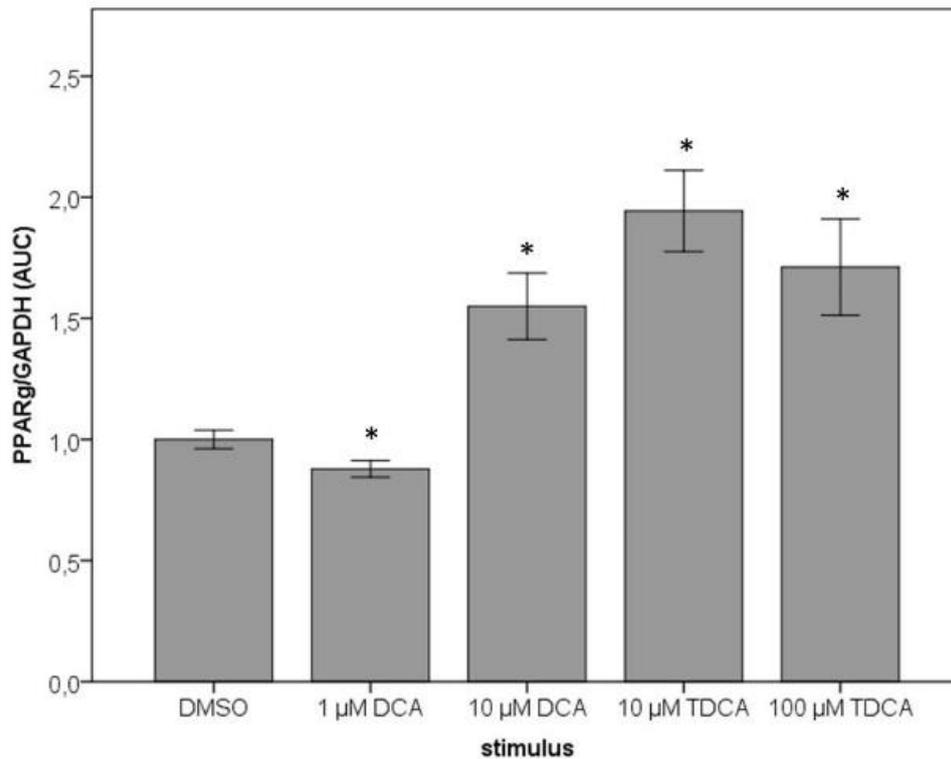


Abbildung 20: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Genexpression von PPAR γ . Es werden Mittelwerte + SEM angezeigt. DMSO Kontrolle; * p<0,05. DCA und TDCA (10 μ M bzw. 10 μ M und 100 μ M) steigern die Genexpression von PPAR γ und sprechen somit für einen antiinflammatorischen Effekt. In niedrigen Konzentrationen (1 μ M) zeigt sich für DCA keine Steigerung der Genexpression von PPAR γ .

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Diskussion

Gallensäuren haben nicht nur die allseits bekannte Funktion in der Verdauung von Fetten. Der Mechanismus der ilealen Resorption und der enterohepatischen Rezirkulation in der Leber von Gallensäuren ist inzwischen gut erforscht und es gibt viele Daten über die vielfältigen systemischen Wirkungen von Gallensäuren. Ferner beeinflussen sie auf verschiedene Weisen den Kohlenhydrat-Stoffwechsel und Lipid-Stoffwechsel, aber auch die Immunregulation, Wachstum und Differenzierung. Die Wirkung der aufgenommenen Gallensäuren durch die Leber über den enterohepatischen Kreislauf ist sehr vielseitig: nano/mikro-molare Fraktionen, die in den systemischen Kreislauf gelangen (sog. Spillover-Pänomen), können unbekannte endokrine Wirkungen haben und metabolische Auswirkungen auch auf andere Organe als die Leber.

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um einen systematischen Einblick in die Veränderungen der Serumgallensäuren und deren Regulatorproteine FGF-19 und FGF-21 während einer oralen Lipidbelastung bei gesunden Probanden zu erhalten.¹⁵⁴

Die Neuheit und das Besondere der vorliegenden Studie basiert auf der Identifizierung von einzelnen Gallensäuren-Subspezies (18) während des OLTT, die für die systemischen Veränderungen des Gesamt-Pools verantwortlich sind. Es wurden unter anderem totale/freie Gallensäuren, primäre/sekundäre Gallensäuren und Taurin-/Glycin-konjugierte Gallensäuren bestimmt, insgesamt 18 verschiedene menschliche Gallensäuren.

Während des OLTT zeigten überraschenderweise alle wichtigen Gallensäurespezies Veränderungen. Doch nur durch einen komplexen technischen Ansatz – die HPLC-MS/MS – war es möglich, gezielt die verschiedenen Gallensäuren im Einzelnen schnell und präzise nachzuweisen und zu quantifizieren. Dieses Verfahren wurde bereits in einer vorangegangenen Studie angewendet, in der Gallensäure-Profile nach einer oralen Glukosebelastung analysiert wurden¹⁴². Diese spezifische Analyse lässt es zu, diejenigen Gallensäuren zu bestimmen, die die beschriebenen Effekte verursachen. Genauso ist es auch möglich diejenigen Gallensäuren einzeln auszuschließen, die nicht zu postprandialen systemischen Änderungen führen.

Mit einer Probandengröße von $n = 100$ Teilnehmern im Vergleich zu ähnlichen Studien mit weniger Teilnehmern ist die Studie groß genug, um statistisch auswertbar und robust gegenüber Ausreißern zu sein^{157–159}.

Es wurde die isolierten Wirkung von oral aufgenommenen Lipiden auf die systemische Gallensäurekonzentration untersucht. Potentielle Nebeneffekte konnten durch Verwendung einer Kohlenhydrat- und Protein- freien Lösung minimiert werden (Vorteil gegenüber sog. „mixed meal“- Testen).

Die Serumproben wurden ausschließlich von gesunden Probanden gewonnen. Personen mit metabolischen Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus wurden ausgeschlossen. Es wäre ergänzend interessant zu Vergleichen, wie sich eine vorbestehende Insulinresistenz während eine kurzfristige orale Lipidbelastung auf die Serumgallensäurespiegel auswirkt. Auch längerfristige Auswirkungen konnten bei einer Testdauer von max. 6h nicht weiter analysiert werden.

Ergänzend zu den Daten aus dem klinischen Kollektiv erfolgten Stimulationsversuche in-vitro an Zellen der Linie 3T3-L1. Die Zell-Linie 3T3-L1 ist ein etabliertes Adipozyten-Modell, welches in einem umfangreichen grundlagenwissenschaftlichen Ansatz die adipozytäre Regulation und Expression von verschiedenen Adipokinen erforscht. In diesem Falle wurden die Effekte einer Stimulation mit Gallensäuren auf Adipozyten auf zellulärer Ebene untersucht. Durch Zusammenschau der Ergebnisse der Korrelationsanalyse des Studienkollektivs und der Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten können neue Erkenntnisse über die Funktion und Regulation von Gallensäuren auf zellulärer sowie physiologischer Ebene gewonnen werden.

4.2 Spezielle Diskussion

Systemische Gallensäurekonzentrationen könnten durch einen passiven Übertragungseffekt über die enterohepatische Zirkulation (Pfortader) oder durch eine direkte Leberfreisetzung über die Lebervenen entstehen. Letzteres ist eine Spekulation, wäre sogleich aber auch eine Hypothese von Gallensäuren als Hepatokine mit pleiotropen systemischen Wirkungen. Studien auf molekularer Ebene haben gezeigt, dass einige Gallensäure-Spezies in der Lage sind, mit den Lipid-Doppelschichten in submicellaren Konzentrationen zu interagieren ¹⁶⁰. So können Störungen der liposomalen Membranen durch die Gallensäuren einige Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen, sowie nachfolgende Signale in der Transduktion im intrazellulärem Proteinhandel beeinflussen.

Gallensäureeffekte auf FXR und TGR5

Die beobachtete Abnahme der freien Gallensäurekonzentrationen im Gegensatz zu den konjugierten Gallensäure-Subspezies deutet auf eine erhöhte Fluktuationsrate der freien Gallensäure zur Konjugation mit Glycin bzw. Taurin als Folge der oralen Lipidaufnahme hin.

Wie bereits von Matysik et al. in der Untersuchung von Gallensäureprofilen während eines oralen Glukosetoleranztests diskutiert ¹⁴², könnte eine postprandiale FXR α -Aktivierung durch Gallensäuren einen Anstieg der Gallensäure-Amidbildungsrate induzieren. Da jedoch weder die Gallensäurerate der Resorption aus dem Dünndarm noch die hepatische Gallensäuresynthese in der Studie quantifiziert wurde, kann für diese Spekulationen aktuell kein Nachweis erbracht werden.

Nicht alle gemessenen Gallensäurespezies aktivieren die Rezeptoren FXR und TGR5 mit derselben Potenz. Diese Tatsache erschwert die Interpretation von Daten, die darauf hindeuten, dass verschiedene Gallensäure-Muster je nach Rezeptoraktivierung und folgender Signaltransduktion unterschiedliche biologische Auswirkungen haben.

Liganden, die an FXR und TGR5 Rezeptoren binden, könnten neue Behandlungsoptionen eröffnen. ¹⁶¹ Ein sich bereits im Zulassungsverfahren befindendes Beispiel ist das Derivat der Chenodesoxycholsäure, die sog. Obeticholsäure, welche zur Behandlung der primären biliären Zirrhose eingesetzt werden soll. ¹⁶² Ein weit bekannteres Beispiel ist die Ursodesoxycholsäure. Die sekundäre Gallensäure wird natürlich vom Menschen nur in kleinen Mengen gebildet. Sie wird unter anderem zur Behandlung von Gallensteinen

(Auflösung cholesterolhaltiger Gallensteine), Refluxgastritis infolge eines Gallensäure-Rückflusses und als symptomatische Therapie bei chronischen Gallenwegserkrankungen (z.B. primär biliäre Zirrhose) oder Leberzirrhose eingesetzt. ^{163,164}

Die sich insbesondere in Leber, Darm und Niere befindenden FXR-Rezeptoren, steuern durch Gallensäuren aktivierte Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren und somit die Expression zahlreicher Gene. Über einen negativen Feedback-Mechanismus wird der eigene Metabolismus der Gallensäuren reguliert und schützt über diesen Weg die Leberzellen vor hohen toxischen intrazellulären Gallensäurekonzentrationen. ¹⁶⁵ Das Ausmaß der Zytotoxizität der Gallensäuren hängt nicht nur von der Konzentrationshöhe der Gallensäuren ab, sondern auch von der Gallensäuren-Spezie. ^{166,167} Als neuer Wirkstoffangriffspunkt neben Gallenwegserkrankungen wurde ein Effekt des nukleären Rezeptors über die Regulation von Transkriptionsfaktoren, die in die Lipid- und Glukosehomöostase und immunmodulatorisch antientzündlich eingreifen, untersucht. Dies bietet die Möglichkeit insbesondere zur Behandlung von Typ-2-Diabetes mellitus und Adipositas. ⁵¹

Der membranständige G-Protein-gekoppelte Gallensäurerezeptor TGR5 übt durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels multiple Wirkungen auf den Stoffwechsel aus. So wird durch die TGR5-Aktivierung die Insulinausschüttung aus den Beta-Zellen in der Bauchspeicheldrüse, sowie die Freisetzung von Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) aus den enteroendokrinen Zellen des Darms die Freisetzung aktiviert. ¹⁶⁸ Außerdem wird durch die TGR5-Aktivierung der Energieverbrauch in Muskeln und Fettgewebe erhöht und der Rezeptor in der Behandlung von metabolischen Erkrankungen und Adipositas neue Möglichkeiten eröffnet werden. Hinzu kommen antientzündliche Effekte. ¹⁶⁹

FGF-19 und FGF-21 im OLTT

Die SHP-unabhängige Gallensäurewirkung kann durch ein Monitoring von FGF-19 untersucht werden. Sowohl unsere Gruppe, als auch andere Institutionen haben gezeigt, dass der Serumspiegel von FGF-19 signifikant 4h nach oraler Lipidaufnahme ansteigt ¹⁴⁴. Bei Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleberkrankung oder Insulinresistenz stellt sich diese Beobachtung nur in abgeschwächter Form dar ¹⁵⁷. Wir beobachteten einen signifikanten, schnellen Anstieg der Gallensäuren nach 2 Stunden während des OLTT - ähnlich beobachtet man einen Gallensäureanstieg nach 1h nach einem oralen Glukose-Toleranztest ¹⁴². Nach diesem Anstieg bleiben die Gallensäuren im Vergleich zum Fasten-Zeitpunkt bis zu 6h deutlich auf einem erhöhten Niveau. Dem postprandialen Anstieg der

Gallensäuren folgt bei gesunden Probanden ein Anstieg von FGF-19 nach 90-120 min¹⁵⁵. Da wir einen signifikanten Anstieg von FGF-19 nach 4h während des OLTT in der Kohorte gemessen haben¹⁴⁴, haben wir diese Daten auf eine mögliche Korrelation des basalen und postprandialen FGF-19-Spiegels mit jeder der gemessenen Gallensäuren getestet. Während FGF-19 mit den Gallensäurekonzentrationen im Fastenzustand nicht korrelierte, zeigte sich eine signifikante positive Korrelationen für den postprandialen (6h) Zustand von FGF-19 mit einigen beschreiben von Gallensäuren.

Der weit verbreiteter Mechanismus für den postprandialen FGF-19-Anstieg im Plasma basiert auf der Freisetzung von FGF-19 aus den Enterozyten. Es folgt die Bindung von Gallensäuren an den FXR α -Rezeptor und dessen Aktivierung. Da die FGF-19-Plasmaspiegel deutlich später (nach 4h nach OLTT) im Vergleich zu den Plasmagallensäuren (nach 2h)^{144,155} ansteigen, könnte die positive Korrelation zwischen FGF-19 und den postprandialen Gallensäuren auf einen alternativen Weg der FGF-19-Sekretion bei oraler Lipidaufnahme hinweisen.

Unklar bleibt derzeit jedoch, warum nur bestimmte Arten von Gallensäuren postprandial mit FGF-19 korrelieren, während andere dies nicht tun. Diese spannende Frage bleibt auch für zukünftige Untersuchungen weiterhin interessant. Da Fettleberkrankungen und Insulinresistenz als Faktoren bekannt sind, die die FGF-19-Sekretion abschwächen können¹⁵⁷, könnte eine individuelle Stoffwechselkonstellation die Korrelation zwischen den Gallensäuren und der FGF-19 Freisetzung beeinflussen.

Im Gegensatz dazu gingen die FGF-21-Konzentrationen während des OLTT signifikant zurück und es gab eine negative Korrelation zwischen FGF-21 und Taurin-konjugierten Gallensäuren während des OLTT. Diese Ergebnisse, die von uns in vivo erzielt wurden, stellen die Ergebnisse in primären Hepatozyten in vitro in Frage³¹. Hier wurde eine Gallensäure-induzierte und FXR α -abhängige Sekretion von FGF-21 festgestellt. Der genaue Mechanismus und der physiologischen Hintergrund, wie und warum sich Gallensäuren nach einem OLTT verändern bleibt unklar.

Prinzipiell gibt es zwei Mechanismen für eine postprandiale Zunahme der systemischen Gallensäuren: ein Spillover-Phänomen aus der portal-venösen Zirkulation oder die direkte Freisetzung durch die Leber. Obwohl FGF-19 typischerweise erst spät nach 4h während des OLTT hochreguliert wird, werden die Gallensäuren schon nach 2h relativ schnell hochreguliert. Dies könnte gegen ein Spillover-Phänomen aus dem Darmkreislauf sprechen und bestärkt die direkte Freisetzung durch die Leber bei oraler Lipid-Aufnahme.

Der letztgenannte potenzielle Mechanismus könnte eine wegweisende Grundlage für eine Rolle der Gallensäuren als "Hepatokine" bilden, der weiter untersucht werden müsste.

Therapeutische Angriffspunkte

Durch eine erhöhte Lipidakkumulation in der Leber kommt es zu einer vermehrten Fettspeicherung. Insbesondere in westlichen Ländern und Schwellenländern liegt eine hohe Prävalenz nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen vor;¹⁷⁰ dazu zählen unter anderem die einfache Lebersteatose, die nicht-alkoholische Fettleber und die Fettleberzirrhose, was insbesondere auf einen Lebensstil mit hyperkalorische, fettreiche Ernährung in Verbindung mit wenig körperlicher Aktivität zurückzuführen ist. Die Fettlebererkrankungen gelten in westlichen Ländern inzwischen als die häufigste chronische Lebererkrankung.

Insgesamt kann von einer hepatischen Manifestation des metabolischen Syndroms ausgegangen werden. Von einem Metabolischen Syndrom spricht man, wenn ein Komplex aus verschiedenen Krankheiten und Risikofaktoren für Herz-/Kreislaufkrankungen vorliegen. Nach heutigem Stand wird zu den diagnostischen Kriterien das gleichzeitige Vorliegen von viszeraler Adipositas, Dyslipidämie (Hypertriglyzeridämie und erniedrigtes HDL-Cholesterin), Bluthochdruck und eine verringerte Glukosetoleranz (aufgrund erhöhter Insulinresistenz) bzw. Typ 2 Diabetes gezählt. Häufig geht eine erhöhte Harnsäure und niedriggradige Entzündungszeichen mit einher.¹⁷¹⁻¹⁷³

Nahezu alle Patienten mit einer Steatosis hepatis sind adipös und haben eine Lipidstoffwechselstörung. Ca. drei Viertel sind zusätzlich von Diabetes mellitus Typ 2 betroffen^{174,175}.

Inbesondere der durch die Insulinresistenz bedingte Hyperinsulinismus begünstigt das erhöhte Vorkommen freier Fettsäuren. Hieraus resultiert wiederum eine verstärkte Steatose, die eine Insulinresistenz begünstigt. Es entsteht ein circulus vitiosus.¹⁷⁶ Auch Adipokine wie Leptin und Adiponektin scheinen eine Rolle zu spielen. Als direkter Gegenspieler von TNF- α wird Adiponektin bei Diabetes mellitus in geringerem Maß exprimiert.¹⁷⁷

Doch nicht nur der direkte Einfluss der freien Fettsäuren ist toxisch für Hepatozyten, sondern auch eine mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress/Sauerstoffradikale (SR) und die damit verbundene verstärkte Expression von Zytokinen wie TNF- α .¹⁷⁸

Bisher gibt es keine zielgerichtete Therapie für die hepatische Steatose, Gewichtsreduktion und die Anpassung des Lebensstils stehen im Vordergrund. Zur Behandlung der familiären Hypercholesterinämie wird u.a. der Anionenaustauscher Colestyramin eingesetzt. Sie binden Gallensäuren und erhöhen so deren Ausscheidung. Der herbeigeführte Gallensäureverlust wird durch die erhöhte Neusynthese ausgeglichen. Vielmehr als eine Senkung der Lipide zeigen sich durch Anionenaustauscherharze auch positive Effekte auf den Diabetes mellitus. Dieser Nebeneffekt könnte auf eine Veränderung des Gallensäurepools mit einer Verschiebung der Zusammensetzung zurückzuführen sein, die eine Aktivierung von FXR verstärkt bewirkt, worüber der Glukosestoffwechsel beeinflusst wird. Möglich ist auch ein verstärkter Transport von Gallensäuren in die hinteren Darmabschnitte, sodass der TGR5-Rezeptor vermehrt aktiviert wird und damit eine vermehrte GLP-1-Ausschüttung herbeiführt wird.

In-vitro-Zellversuche

Die Rolle des Fettgewebes wurde lange Zeit unterschätzt. Es wurde als bloßes Speicherorgan angesehen. Mit zunehmender Prävalenz von Adipositas ist jedoch die Adipozytenfunktion in den Mittelpunkt gerückt und das Fettgewebe wird als ein wesentliches endokrines Organ anerkannt. Ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen, die für die Funktionsstörung des Fettgewebes verantwortlich sind, ist erforderlich.¹⁷⁹ Überernährung kann eine unkontrollierte Entzündungsreaktion im weißen Fettgewebe auslösen, was zu einer chronischen, leicht entzündlichen Erkrankung führt und somit das Fortschreiten einer Insulinresistenz fördert. Bei ungesunder Fettleibigkeit ist die Speicherkapazität von subkutanem Fettgewebe begrenzt. Eine erhöhte Nährstoffzufuhr und somit Kalorienüberladung führt zur Fettansammlung in ektopischen Geweben (z. B. Leber, Skelettmuskel und Herz) und in den viszeralen Fettdepots.¹⁷⁹

Chen et al.¹⁸⁰ zeigten, dass es Hinweise darauf gibt, dass, CDCA Fettleibigkeit und Hyperglykämie verhindern kann. Dieser vorteilhafte Effekt wird über die Aktivierung von TGR5 und die Hemmung der PPAR γ -Transkriptionsaktivität vermittelt. In einem Mausmodell wurde beobachtet, dass bei einer diätbedingten Fettleibigkeit die Zugabe von CDCA eine Gewichtsabnahme bewirkt. Darüber hinaus zeigte sich, dass durch eine Behandlung mit CDCA die Glukosetoleranz und Seruminsulinspiegel signifikant verbessert wurden. CDCA ist ein natürlicher Ligand von TGR5, der eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung des Glukosemetabolismus hat. Zusätzlich konnte

gezeigt werden, dass CDCA die Adipozyten-Differenzierung in 3T3-L1-Zellen inhibiert, sowie auch die ligandenstimulierte Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ (PPAR γ) Transkriptionsaktivität hemmt.

Auch Shihabudeen et al.¹⁸¹ zeigten in 3T3-L1-Adipozyten, dass CDCA mehrere der getesteten pro-inflammatorischen Adipokine (TNF- α , MCP-1, IL-6, Chemerin, PAI (*Plasminogen activator inhibitor-1*), RBP4 (*Retinol-binding protein 4*), Resistin, Vaspin) unterdrückte und die Freisetzung der wichtigsten entzündungshemmenden und insulinsensibilisierenden Adipokine (Adiponektin, Leptin) verstärkte.

Dennoch liegen bisher nur wenige Daten zur direkten Wirkung von Gallensäuren in Adipozyten oder im weißen Fettgewebe vor. In neueren Studien wurde über regulatorische Auswirkungen von bestimmten Gallensäurespezies - insbesondere von CDCA und UDCA - auf das Fettgewebe berichtet.^{182,183} In den meisten Studien wurden jedoch nur einzelnen Gallensäurespezies getestet. Daher war es unser Ziel, verschiedene Gallensäurearten hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Wirkung auf Adipozyten zu testen.

Die Versuche zeigten, dass CA und DCA die Lipolyse in Adipozyten hemmen und die Genexpression von MCP-1 und Leptin unterdrücken, PPAR γ hingegen wird verstärkt exprimiert.

Unsere Arbeitsgruppe erstellte in weiteren Experimenten ein detailliertes Expressionsprofil der Rezeptoren FXR, TGR5, FGFR1 und BSEP während der Adipozyten-Differenzierung sowohl im Mausmodell als auch im menschlichen Fettgewebe.¹⁸⁴ Auch wurde der Effekt von verschiedenen Gallensäuren auf die Adipokinsekretion untersucht, in einem besonderen Fokus standen Adiponektin und Resistin.¹⁸⁴

Es zeigte sich, dass TNF und LPS die Freisetzung von MCP-1 aus Adipozyten induzierten, sowie auch die Lipolyse. Die TNF-induzierte Lipolyse konnte durch die Gallensäuren CA und DCA antagonisiert werden. Proinflammatorisches Resistin wurde hingegen durch CA und GCA induziert.

Diese Daten liefern weitere Hinweise auf funktionelle Gallensäure-Signalwege in Adipozyten und argumentieren für bestimmte MCP-1-bezogene entzündungshemmende Wirkungen von Gallensäuren in TNF- und LPS-induzierter Entzündung.

Die These, dass systemische Gallensäuren einen wichtigen Teil des hormonellen Netzwerkes in der Adipozytenphysiologie darstellen, wird erneut untermauert.¹⁸⁵

Bei den beschriebenen Effekten der Gallensäuren auf den Stoffwechsel und inflammatorische Prozesse scheint es sich jedoch keineswegs um Klasseneffekte von Gallensäuren zu handeln, sondern um spezifische Effekte der einzelnen Spezies, auch in Abhängigkeit der Konzentrationen. Diese Beobachtung konnte sowohl im OLTT, als auch in den in vitro- Versuchen gezeigt werden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften sollte jede einzelne Gallensäure-Spezies auf spezifischen Wirkungen und Rezeptoraffinitäten getestet werden. In älteren Studien wurde mit besonderem Blick auf die chemischen und strukturellen Eigenschaften der Struktur-Funktions-Beziehung zwischen verschiedenen Gallensäuren und Derivaten als FXR - oder TGR5 – Liganden berichtet, die sowohl für die Signalwege entscheidend sind.^{186–188}

Für die Zukunft gilt es, diese Effekte weiter zu differenzieren und bisher unbekannte Signalwege und Angriffspunkte im Stoffwechsel zu beschreiben.

Die Ergebnisse leisten einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Funktion und Regulation der Gallensäuren und bieten die Grundlage für neue Forschungsinitiativen insbesondere im Hinblick auf die endokrine Kommunikation zwischen Fettgewebe und inflammatorischen Prozessen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen im vorliegenden Studienkollektiv und die in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurden 2016 im „PLoS One“ publiziert¹⁵⁴ und/oder in Teilen auf der DACH-Tagung 2016 in München präsentiert.

Kernaussagen

- Die Gesamt-Gallensäuren wiesen nach oraler Lipidbelastung einen frühen Anstieg (nach 2h) auf, sie blieben bis zu 6h erhöht. Ein postprandialer Anstieg von FGF-19 zeigte sich nach 4h und ein postprandialer Anstieg von Triglyceriden zwischen 2h und 4h.
 - Von den primären Gallensäuren blieb CA nach dem OLTT unverändert, während ein Absinken der CDCA-Spiegel bei 4h beobachtet wurde.
 - Von den sekundären Gallensäuren zeigte sich eine Senkung von LCA, während die anderen Gallensäuren unverändert blieben.
 - Eine signifikante und positive Korrelation zwischen FGF-19 und verschiedenen Gallensäuren konnte gezeigt werden. Die stärkste Korrelation ergab sich für FGF-19 und Taurin-konjugierten Gallensäuren.
 - Taurin-konjugierte Gallensäuren korrelierten signifikant negativ mit FGF-21.
 - Frauen hatten ein höheres Level an Taurin-konjugierter Gallensäuren, während das Geschlecht auf Glycin-konjugierte Gallensäuren keinen Einfluss hatte.
 - Bei Nutzerinnen hormoneller Kontrazeption zeigten sich höhere Level von Taurin-konjugierten Gallensäuren.
-
- CA und DCA wirkten hemmend auf die basale Lipolyserate von Adipozyten.
 - CA und DCA hatten einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von Leptin in Adipozyten.
 - CA und DCA hatten einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von CCL2 in Adipozyten.
 - TDCA und DCA (10 μ M) steigerten die Genexpression von PPAR γ in Adipozyten.
 - β -TMCA schien die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten möglicherweise zu fördern.

5 Zusammenfassung

Die pleiotrope Funktion von Gallensäuren mit hormonähnlicher Wirkung im Stoffwechsel ist ein sehr innovatives, translationales und komplexes Thema.

Mit der vorliegenden Studie konnte erstmals die Zeitkinetik von Gallensäuren, Triglyzeriden und FGF-19 im Serum bei gesunden Personen nach einer reinen Lipidaufnahme aufgezeigt werden. Sowohl die Gesamt-Gallensäuren, als auch die Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensäuren werden sehr schnell bereits 2h nach ihrer Aufnahme systemisch hochreguliert. Dieser schnelle Anstieg der Gallensäuren geht dem Anstieg der Triglyzeride voraus (Abb. 11), der typischerweise zwischen 2h und 4h liegt. FGF-19 wird nach 4h hochreguliert. Eine positive, signifikante Korrelation konnte auch zwischen einigen Gallensäure-Spezies und FGF-19- Spiegeln gezeigt werden.

Die essentielle Rolle von Gallensäuren in der enterohepatischen Zirkulation ist bekannt. Zukünftig gilt es, die exakten Signalwege der Gallensäuren, FGF-19 und FGF-21 im systemischen Kreislauf und in den peripheren Organen weiter aufzuklären. Genauso gilt es auf zellulärer Ebene zu untersuchen, ob postprandial hochregulierte Gallensäuren und FGF-19 die Aktivierung von Beta-Klotho regulieren. Dies könnte vor allem im metabolischen Kontext von großer Bedeutung sein.

Ergänzend und basierend auf den Daten des klinischen Kollektivs erfolgten Stimulationsversuche in-vitro an Zellen der Linie 3T3-L1, um die Effekte einer Stimulation mit Gallensäuren auf Adipozyten auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Die Stimulation reifer 3T3-L1-Adipozyten mit verschiedenen Gallensäurespezies hat signifikante und unterschiedliche Auswirkungen auf die Gen-Expressionsniveaus von Adipokinen- und Zytokinen, sowie auf die basale Lipolyserate. β -TMCA zum Beispiel scheint zur Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten beizutragen. In weiteren Untersuchungen werden die Gallensäure-Effekte auf die Gen- und Proteinexpression von Adipozyten-Differenzierungsmarkern analysiert.

Durch Kombination der Ergebnisse der Korrelationsanalyse des Studienkollektivs und der Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten können neue Erkenntnisse über die Funktion und Regulation von Gallensäuren auf zellulärer sowie physiologischer Ebene gewonnen werden. Eine besondere Bedeutung kommt der differenzierten Betrachtung einzelner Gallensäurespezies zu, da es sich scheinbar nicht um Klasseneffekte handelt, sondern um spezifische Effekte einzelner Gallensäuren.

5 Summary

The pleiotropic function of bile acids with hormone-like effects in the metabolism is a very exciting and complex topic.

The present clinical study is the first to reveal the time kinetics of bile acids, triglycerides and FGF-19 in the serum of a healthy person after a pure lipid uptake. Total bile acids as well as taurine- and glycine- conjugated bile acids are systemically upregulated very quickly within 2h after their uptake. The rapid increase in bile acids precedes the increase in triglycerides (fig. 11), which usually is between 2h and 4h. FGF-19 is upregulated after 4h. A significant positive correlation between some bile acid species and FGF-19 mirrors could also be shown.

The essential role of bile acids in enterohepatic circulation is well established. In the future, it will be important to further explain the exact signaling pathways of the bile acids and of FGF-19 and FGF-21 in the systemic circulation and in peripheral tissues. Furthermore, it should be analysed at the cellular level whether postprandial by upregulated bile acids and FGF-19 modulate the activation of beta-klotho. This could be especially important in a metabolic context.

In addition, based on the the data of the clinical collective, experiments with the murine cell-line of 3T3-L1 adipocytes and preadipocytes were performed in order to investigate the effects of bile acids on adipocytes.

The stimulation of mature 3T3-L1-adipocytes with different bile acid species has a significant and different effect on gene expression levels of adipokines and cytokines as well as on lipolysis. β -TMCA for example seems to modulate the differentiation of fibroblasts into adipocytes. Bile acid effects on gene- and protein expression of adipocyte differentiation markers are planned to be analysed as part of further clinical studies.

By combining the results of the clinical study collective and the results from cell culture experiments, new insights into function and regulation of bile acids at the cellular and physiological level can be gained. What is of particular importance is a differentiated approach to single bile acid species since each bile acid might exerts specific effects.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

ABST: apical sodium dependent bile acid transporter

Ask1: Apoptosis signal-regulating kinase 1

ATP: Adenosintriphosphat

BMI: Body-Mass-Index (Körpermasseindex kg/m²)

BSEP: Bile salt export pump

CA: Cholsäure

cAMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat

CCL-2: CC-chemokine ligand

CDCA: Chenodesoxycholsäure

COX-2: Cyclooxygenase-2

CRP: C-reactive Protein

CSF-1 = M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor

CYP7A1: cytochrome P450 enzyme cholesterol 7 α -hydroxylase

DCA: Desoxycholsäure

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

FFA: free fatty acid = freie Fettsäure

FGF-15/19: fibroblast growth factor 15/19

FGFR4: fibroblast growth factor receptor 4

FOXO1: Forkhead Box Protein O1

FXR: farnesoid X receptor

g: Gramm

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GCA: Glycocholsäure

GCDCA: Glycochenodesoxycholsäure

GDCA: Glycodesoxycholsäure

GHDCA: Glykohyodesoxycholsäure

GHS-Rezeptor: Growth Hormone Secretagogue Receptor

GLCA: Glycolithocholsäure

GLP-1: glucagon-like peptide-1
GR: glucocorticoid receptor
GS: Gallensäure
GUDCA: Glycoursodesoxycholsäure
h: hour
HDCA: Hyodesoxycholsäure
HDL: High Density Lipoprotein
HNF-4: hepatocyte nuclear factor-4
IBABP: Cytosolic ileal bile acid binding protein
IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgM: Immunglobulin-M
IL: Interleukin
IRS-1: Insulin receptor substrate 1
JNK: c-jun N-terminal kinase
kcal: Kilokalorie
Kg: Kilogramm
LCA: Lithocholsäure
LC-MS/MS: Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LDH: Laktat-Dehydrogenase
LDL: Low Density Lipoprotein
LPS: Lipopolysachyrid
LRH-1: liver receptor homologue-1
M: molar (mol/l)
MCP-1: monocyte chemotactic protein 1
ml: Milliliter
mmHg: Millimeter Quecksilbersäule
MRPs: multi drug resistant proteins
NAD⁺: Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH/H⁺: Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NF-κB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm: Nanometer
NTCP: Na⁺ taurocholate co-transporting peptide
OATPs: organic anion transport polypeptides
OLI: oral lipid ingestion

OLTT: Oraler Lipid Toleranztest
OST: organic solute transporters
PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PCR: polymerase chain reaction
PDGF: Platelet-derived growth factor
PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGI₂: Prostacyclin
PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
RNA: Ribonukleinsäure
Rpm: revolutions per minute
SD: Standardabweichung
SEM: Standardfehler des Mittelwertes
SHP: small heterodimer partner
SOCS-1: Suppressor of cytokine signaling 1
Sog.: sogenannt
SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c
TAG: Triacylglycerid
TCA: Taurocholsäure
TCDCA: Taurochenodesoxycholsäure
TDCA: Taurodesoxycholsäure
TGs: triglycerides
TGF- β : Transforming growth factor beta
TGR5: G-protein-coupled bile acid receptor
THDCA: Taurohyodesoxycholsäure
TLCA: Taurolithocholsäure
TNF: Tumornekrosefaktor
TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TUDCA: Tauroursodesoxycholsäure
u.a.: unter anderem
UCP-1: Mitochondrial uncoupling protein 1
UDCA: Ursodesoxycholsäure
VLDL: very low density lipoprotein.
 μ l: Mikroliter

7 Darstellungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung von Gallensäuren.....	5
Abbildung 2: Synthese der Gallensäuren im Detail	6
Abbildung 3: Übersicht Signalkaskaden und Stoffwechsellangriffspunkte von Gallensäuren.....	7
Abbildung 4: Schematisch dargestellte Entwicklung einer weißen Fettzelle	11
Abbildung 5: Zusammensetzung der Lipidlösung OLI	29
Abbildung 6: Flussschema eines LC-MS/MS-Systems mit Ionenchromatogrammen ..	31
Abbildung 7: Aufbau eines Triple-Quad.....	32
Abbildung 8: Serumtriglycerid- und Gallensäurewerte während des OLTT (0, 2, 4, 6h).....	43
Abbildung 9: Zeitabhängige Variationen von Gallensäuren während des OLTT	45
Abbildung 10: Postprandialer Verlauf von Serum-Gesamtgallensäuren und Serum FGF-19 während des OLTT.....	47
Abbildung 11: Korrelationsanalyse der Serum-FGF-19-Spiegel mit Gesamt- und Glycin- konjugierten Gallensäuren	48
Abbildung 12: Effekte des Geschlechts auf den Serumspiegel von Taurin-konjugierten Gallensäuren.....	51
Abbildung 13: Effekte der hormonellen Empfängnisverhütung auf den Serumspiegel von Taurin-konjugierten Gallensäuren.....	52
Abbildung 14: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Lipolyse.....	56
Abbildung 15: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Genexpression von CCL2.	57
Abbildung 16: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Genexpression von Leptin.....	58
Abbildung 17: Effekte der Gallensäurestimulation von 3T3-L1 Adipozyten auf die Genexpression von PPAR γ	59

Tabelle 1: Einteilung der Gallensäuren	5
Tabelle 2: Schlüsselenzyme der Gallensäuresynthese.....	6
Tabelle 3: Auswirkung von FXR auf den Gallensäure-, Glukose, und Lipidstoffwechsel, Inflammation, Fibrose und Atherosklerose	9
Tabelle 4: Klinische und demographische Daten	39
Tabelle 5: Gallensäureprofile während des OLTT	40
Tabelle 6: Gallensäureprofile während des OLTT im Detail	42
Tabelle 7: Korrelation zwischen FGF-19-Spiegel (pg / ml) und verschiedenen Gallensäurespezies (nmol / ml) 6 Stunden nach OLTT	49
Tabelle 8: Gallensäurenkonzentrationen (nmol/l) bei Frauen/Männern und Benutzerinnen /Nicht-Nutzern hormoneller Verhütung nach 6h während OLTT.....	53
Tabelle 9: 3T3-L1 Fibroblasten während der Adipozytendifferenzierung.....	55

8 Literaturverzeichnis/ Quellenangaben

1. Efentakis M, Dressman JB. Gastric juice as a dissolution medium: Surface tension and pH. In: *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. Vol 23. Springer-Verlag France; 1998:97-102. doi:10.1007/BF03189322
2. Bates TR, Gibaldi M, Kanig JL. Rate of dissolution of griseofulvin and hexoestrol in bile salt solutions. *Nature*. 1966;210(5043):1331-1333. doi:10.1038/2101331a0
3. Fiorucci S, Cipriani S, Baldelli F, Mencarelli A. Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders. *Prog Lipid Res*. 2010;49(2):171-185. doi:10.1016/j.plipres.2009.11.001
4. Fiorucci S, Mencarelli A, Distrutti E, Palladino G, Cipriani S. Targeting Farnesoid-X-Receptor: From Medicinal Chemistry to Disease Treatment. *Curr Med Chem*. 2010;17(2):139-159. doi:10.2174/092986710790112666
5. Fiorucci S, Cipriani S, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Baldelli F. Counter-Regulatory Role of Bile Acid Activated Receptors in Immunity and Inflammation. *Curr Mol Med*. 2010;10(6):579-595. doi:10.2174/1566524011009060579
6. Chiang JYL. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009;50(10):1955-1966. doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200
7. Chiang JYL. Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Research*. 2017;6. doi:10.12688/f1000research.12449.1
8. Kurth B-Ma. Erste Ergebnisse aus der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung, Bd55*. 2012:S980-990.
9. World Health Organization. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation*. World Health Organization; 2000.
10. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016;22(7 Suppl):s176-85.
11. Li Y, Lu L-G. Therapeutic Roles of Bile Acid Signaling in Chronic Liver Diseases. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(4):425-430. doi:10.14218/JCTH.2018.00025
12. Liu H, Pathak P, Boehme S, Chiang JYL. Cholesterol 7 α -hydroxylase protects the

- liver from inflammation and fibrosis by maintaining cholesterol homeostasis. *J Lipid Res.* 2016;57(10):1831-1844. doi:10.1194/jlr.M069807
13. Hageman J, Herrema H, Groen AK, Kuipers F. A Role of the Bile Salt Receptor FXR in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(8):1519-1528. doi:10.1161/ATVBAHA.109.197897
 14. Li T, Francl JM, Boehme S, et al. Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity. *J Biol Chem.* 2012;287(3):1861-1873. doi:10.1074/jbc.M111.305789
 15. Das A, Yaqoob U, Mehta D, Shah VH. FXR Promotes Endothelial Cell Motility Through Coordinated Regulation of FAK and MMP-9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):562-570. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182725
 16. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 2006;439(7075):484-489. doi:10.1038/nature04330
 17. Adorini L, Pruzanski M, Shapiro D. Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov Today.* 2012;17(17-18):988-997. doi:10.1016/J.DRUDIS.2012.05.012
 18. Lee H, Zhang Y, Lee FY, Nelson SF, Gonzalez FJ, Edwards PA. FXR regulates organic solute transporters α and β in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J Lipid Res.* 2006;47(1):201-214. doi:10.1194/jlr.M500417-JLR200
 19. Prawitt J, Staels B. Bile Acid Sequestrants: Glucose-Lowering Mechanisms. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(S1):S-3-S-8. doi:10.1089/met.2010.0096
 20. Stroeve JHM, Brufau G, Stellaard F, Gonzalez FJ, Staels B, Kuipers F. Intestinal FXR-mediated FGF15 production contributes to diurnal control of hepatic bile acid synthesis in mice. *Lab Invest.* 2010;90(10):1457-1467. doi:10.1038/labinvest.2010.107
 21. Staels B, Handelsman Y, Fonseca V. Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. *Curr Diab Rep.* 2010;10(1):70-77. doi:10.1007/s11892-009-0087-5
 22. Holt JA, Luo G, Billin AN, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.*

- 2003;17(13):1581-1591. doi:10.1101/gad.1083503
23. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al. Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* (80-). 1999;284(5418):1365-1368. doi:10.1126/science.284.5418.1365
 24. Matsubara T, Li F, Gonzalez FJ. FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;368(1-2):17-29. doi:10.1016/j.mce.2012.05.004
 25. Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, et al. 6 α -Ethyl-Chenodeoxycholic Acid (6-ECDCA), a Potent and Selective FXR Agonist Endowed with Anticholestatic Activity. *J Med Chem*. 2002;45(17):3569-3572. doi:10.1021/jm025529g
 26. Zhang F, Yu L, Lin X, et al. Minireview: Roles of fibroblast growth factors 19 and 21 in metabolic regulation and chronic diseases. *Mol Endocrinol*. 2015;29(10):1400-1413. doi:10.1210/me.2015-1155
 27. Angelin B, Larsson TE, Rudling M. Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators--a critical appraisal. *Cell Metab*. 2012;16(6):693-705. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.001
 28. Kharitonov A. FGFs and metabolism. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):805-810. doi:10.1016/J.COPH.2009.07.001
 29. Cicione C, Degirolamo C, Moschetta A. Emerging role of fibroblast growth factors 15/19 and 21 as metabolic integrators in the liver. *Hepatology*. 2012;56(6):2404-2411. doi:10.1002/hep.25929
 30. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem*. 2007;282(37):26687-26695. doi:10.1074/jbc.M704165200
 31. Cyphert HA, Ge X, Kohan AB, Salati LM, Zhang Y, Hillgartner FB. Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J Biol Chem*. 2012;287(30):25123-25138. doi:10.1074/jbc.M112.375907
 32. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(3):235-253. doi:10.1038/nrd2792

33. Jones S. Mini-Review: Endocrine Actions of Fibroblast Growth Factor 19. *Mol Pharm.* 2008;5(1):42-48. doi:10.1021/mp700105z
34. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2005;2(4):217-225. doi:10.1016/j.cmet.2005.09.001
35. Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000;6(3):517-526. doi:10.1016/S1097-2765(00)00051-4
36. Barrowman JA. Intestinal Absorption of the Fat-Soluble Vitamins: Physiology and Pharmacology. In: Springer, Berlin, Heidelberg; 1984:647-689. doi:10.1007/978-3-642-69505-6_17
37. Bull LN, Vargas J. Serum bile acids in intrahepatic cholestasis of pregnancy: not just a diagnostic test. *Hepatology.* 2014;59(4):1220-1222. doi:10.1002/hep.26888
38. Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: Structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 2007;24(10):1803-1823. doi:10.1007/s11095-007-9289-1
39. Hundt M, John S. *Physiology, Bile Secretion.*; 2018.
40. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest.* 1998;101(1):22-32. doi:10.1172/JCI1244
41. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic Bile Salt Transporters in Normal Physiology and Liver Disease. *Gastroenterology.* 2004;126(1 SUPPL. 1):322-342. doi:10.1053/j.gastro.2003.06.005
42. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, eds. *Biochemie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. doi:10.1055/b-002-6235
43. Monte MJ, Marin JJG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2009;15(7):804-816. doi:10.3748/wjg.15.804

44. Russell DW. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu Rev Biochem.* 2003;72(1):137-174. doi:10.1146/annurev. biochem. 72.121801.161712
45. Warren DB, Chalmers DK, Hutchison K, Dang W, Pouton CW. Molecular dynamics simulations of spontaneous bile salt aggregation. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2006;280(1-3):182-193. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.02.009
46. Ma H, Patti ME. Bile acids, obesity, and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(4):573-583. doi:10.1016/j.bpg.2014.07.004
47. Garbutt JT, Heaton KW, Lack L, Tyor MP. Increased Ratio of Glycine- to Taurine-Conjugated Bile Salts in Patients with Ileal Disorders. *Gastroenterology.* 1969;56(4):711-720. doi:10.1016/S0016-5085(69)80032-6
48. Chiang JYL. Bile acid regulation of gene expression: Roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev.* 2002;23(4):443-463. doi:10.1210/er.2000-0035
49. Roberto Pellicciari *,‡, Gabriele Costantino ‡ and, Fiorucci§ S. Farnesoid X Receptor: From Structure to Potential Clinical Applications. 2005. doi:10.1021/JM0582221
50. Staels B, Handelsman Y, Fonseca V. Bile Acid Sequestrants for Lipid and Glucose Control. *Curr Diab Rep.* 2010;10(1):70-77. doi:10.1007/s11892-009-0087-5
51. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol Rev.* 2009;89(1):147-191. doi:10.1152/physrev.00010.2008
52. Kumar DP, Asgharpour A, Mirshahi F, et al. Activation of Transmembrane Bile Acid Receptor TGR5 Modulates Pancreatic Islet α Cells to Promote Glucose Homeostasis. *J Biol Chem.* 2016;291(13):6626-6640. doi:10.1074/jbc.M115.699504
53. Meloni AR, DeYoung MB, Lowe C, Parkes DG. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic β -cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15(1):15-27. doi:10.1111/j.1463-1326.2012.01663.x
54. Shneider BL. Intestinal Bile Acid Transport: Biology, Physiology, and

- Pathophysiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;32(4):407-417. doi:10.1097/00005176-200104000-00002
55. Song K-H, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang JYL. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology.* 2009;49(1):297-305. doi:10.1002/hep.22627
 56. Bhatnagar S, Damron HA, Hillgartner FB. Fibroblast Growth Factor-19, a Novel Factor That Inhibits Hepatic Fatty Acid Synthesis. *J Biol Chem.* 2009;284(15):10023-10033. doi:10.1074/jbc.M808818200
 57. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000;6(3):507-515. doi:10.1016/s1097-2765(00)00050-2
 58. Redinger RN. The Role of the Enterohepatic Circulation of Bile Salts and Nuclear Hormone Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis: Bile Salts as Ligands for Nuclear Hormone Receptors. *Can J Gastroenterol.* 2003;17(4):265-271. doi:10.1155/2003/190784
 59. Verspohl EJ, Weiland F. Fettgewebe: Größtes endokrines Organ des Körpers. | *Pharm Zeitung.* 2006.
 60. Schling P, Löffler G. Cross talk between adipose tissue cells: impact on pathophysiology. *News Physiol Sci.* 2002;17:99-104.
 61. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.* 2013;9(2):191-200. doi:10.5114/aoms.2013.33181
 62. GREGOIRE FM, SMAS CM, SUL HS. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev.* 1998;78(3):783-809. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783
 63. Welsch U, Deller T. *Lehrbuch Histologie.* Elsevier, Urban & Fischer; 2010.
 64. Waldeyer A, Anderhuber F, Pera F, Streicher J. *Waldeyer - Anatomie Des Menschen, Lehrbuch Und Atlas in Einem Band TT - Human Anatomy.* De Gruyter; 2012. doi:10.1515/9783110228632
 65. Charó NL, Rodríguez Ceschan MI, Galigniana NM, Toneatto J, Piwien-Pilipuk G.

- Organization of nuclear architecture during adipocyte differentiation. *Nucleus*. 2016;7(3):249-269. doi:10.1080/19491034.2016.1197442
66. Lüllmann-Rauch R *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag . 3.Auflage 2009.
 67. Kiess W, Petzold S, Töpfer M, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008;22(1):135-153. doi:10.1016/j.beem.2007.10.002
 68. Laclaustra M, Corella D, Ordovas JM. Metabolic syndrome pathophysiology: The role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(2):125-139. doi:10.1016/j.numecd.2006.10.005
 69. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001;2(4):282-286. doi:10.1093/embo-reports/kve071
 70. Guerre-Millo M. Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(10):855-861. doi:10.1007/BF03344048
 71. Ibarguren M, López DJ, Escribá P V. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2014;1838(6):1518-1528. doi:10.1016/j.bbamem.2013.12.021
 72. Löffler G. *Biochemie Und Pathobiochemie*. Springer; 2012.
 73. Chon S-H, Zhou YX, Dixon JL, Storch J. Intestinal Monoacylglycerol Metabolism. *J Biol Chem*. 2007;282(46):33346-33357. doi:10.1074/jbc.M706994200
 74. Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:365-393. doi:10.1146/annurev.nutr.20.1.365
 75. Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R. Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16(3):333-340.
 76. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365(9467):1333-1346. doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X

77. Slawik M, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr.* 2007;2(1):41-45. doi:10.1007/s12263-007-0014-9
78. Slawik M, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Res Rev.* 2006;5(2):144-164. doi:10.1016/j.arr.2006.03.004
79. Medina-Gomez G, Virtue S, Lelliott C, et al. The Link Between Nutritional Status and Insulin Sensitivity Is Dependent on the Adipocyte-Specific Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-2 Isoform. *Diabetes.* 2005;54(6):1706-1716. doi:10.2337/diabetes.54.6.1706
80. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(7):461-470. doi:10.1016/j.tips.2015.04.014
81. Blüher M. Inflammation des Fettgewebes. *Der Diabetol.* 2019;15(4):296-304. doi:10.1007/s11428-019-0450-3
82. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A Role for C/EBP β in Regulating Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activity during Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001;276(21):18464-18471. doi:10.1074/jbc.M100797200
83. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793-1801. doi:10.1172/JCI29069
84. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes.* 2002;51(5):1596-1600. doi:10.2337/diabetes.51.5.1596
85. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808. doi:10.1172/JCI19246
86. Canello R, Henegar C, Viguerie N, et al. Reduction of Macrophage Infiltration and Chemoattractant Gene Expression Changes in White Adipose Tissue of Morbidly Obese Subjects After Surgery-Induced Weight Loss. *Diabetes.* 2005;54(8):2277-2286. doi:10.2337/diabetes.54.8.2277
87. Schmitz J, Evers N, Awazawa M, et al. Obesogenic memory can confer long-term

- increases in adipose tissue but not liver inflammation and insulin resistance after weight loss. *Mol Metab.* 2016;5(5):328-339. doi:10.1016/j.molmet.2015.12.001
88. Castoldi A, De Souza CN, Saraiva Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol.* 2016;6(JAN). doi:10.3389/fimmu.2015.00637
 89. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448
 90. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97. doi:10.1038/nri2921
 91. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13(2):453-461. doi:10.2741/2692
 92. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35. doi:10.1038/nri978
 93. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, et al. Alternative M2 Activation of Kupffer Cells by PPAR δ Ameliorates Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2008;7(6):496-507. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.003
 94. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-184. doi:10.1172/JCI29881
 95. Odegaard JI, Chawla A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6(1):275-297. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130138
 96. Bluher M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clin Sci.* 2016;130(18):1603-1614. doi:10.1042/CS20160005
 97. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(11):633-643. doi:10.1038/nrendo.2017.90
 98. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):1023-1033. doi:10.1210/jc.2006-1055

99. Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, et al. Macrophage Infiltration into Omental Versus Subcutaneous Fat across Different Populations: Effect of Regional Adiposity and the Comorbidities of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2240-2247. doi:10.1210/jc.2006-1811
100. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Metab.* 2010;299(3):E506-E515. doi:10.1152/ajpendo.00586.2009
101. Hotamisligil G k. S, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF-alpha- and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Science (80-)*. 1996;271(5249):665-670. doi:10.1126/science.271.5249.665
102. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science.* 2003;302(5651):1710-1711. doi:10.1126/science.1092952
103. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772-783. doi:10.1038/nri1937
104. Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, Ghenev PI. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des.* 2003;9(12):1023-1031.
105. Friedman J. Leading the charge in leptin research: An interview with Jeffrey Friedman. *DMM Dis Model Mech.* 2012;5(5):576-579. doi:10.1242/dmm.010629
106. Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med.* 2013;7(2):207-222. doi:10.1007/s11684-013-0263-5
107. Wang X, Ye G, Sun J. Leptin and the feedback regulation of body weight. *Wei Sheng Yan Jiu.* 1999;28(5):318-320.
108. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann Intern Med.* 2010;152(2):93. doi:10.1059/0003-4819-152-2-201001190-00008
109. Kleine B, Rossmannith W. *Hormone Und Hormonsystem - Lehrbuch Der Endokrinologie.* 2. Auflage. Springer Verlag; 2014. doi:10.1007/978-3-642-37092-2

110. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*. 2015;64(1):24-34. doi:10.1016/j.metabol.2014.08.004
111. Khazaei M, Tahergorabi Z. Leptin and its cardiovascular effects: Focus on angiogenesis. *Adv Biomed Res*. 2015;4(1):79. doi:10.4103/2277-9175.156526
112. Coen G. Leptin and bone metabolism. *J Nephrol*. 17(2):187-189.
113. Le Saux S, Rousseau F, Barbier F, et al. Molecular dissection of human interleukin-31-mediated signal transduction through site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 2010;285(5):3470-3477. doi:10.1074/jbc.M109.049189
114. Baumann H, Morella KK, White DW, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(16):8374-8378. doi:10.1073/pnas.93.16.8374
115. Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett*. 2003;546(1):45-50. doi:10.1016/S0014-5793(03)00440-X
116. Iikuni N, Lam QLK, Lu L, Matarese G, La Cava A. Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev*. 2008;4(2):70-79. doi:10.2174/157339508784325046
117. Garaulet M, Hernández-Morante JJ, De Heredia FP, Tébar FJ. Adiponectin, the controversial hormone. *Public Health Nutr*. 2007;10(10 A):1145-1150. doi:10.1017/S1368980007000638
118. Guerre-Milo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70084-8
119. Shibata R, Ouchi N, Ohashi K, Murohara T. The role of adipokines in cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2017;70(4):329-334. doi:10.1016/j.jjcc.2017.02.006
120. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J*. 2004;68(11):975-981. doi:10.1253/circj.68.975
121. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14(6):561-566.

doi:10.1097/00041433-200312000-00003

122. Schäffler A, Springer-Verlag GmbH. *Funktionsdiagnostik in Endokrinologie, Diabetologie Und Stoffwechsel*. 2018.
123. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-312. doi:10.1038/35053000
124. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):622. doi:10.1111/J.1476-5381.2011.01369.X
125. Moschen AR, Gerner RR, Tilg H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. *Curr Pharm Des*. 2010;16(17):1913-1920.
126. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties. *J Immunol*. 2007;178(3):1748-1758. doi:10.4049/jimmunol.178.3.1748
127. Filippatos T, Randeve H, Derdemezis C, Elisaf M, Mikhailidis D. Visfatin/PBEF and Atherosclerosis-Related Diseases. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8(1):12-28. doi:10.2174/157016110790226679
128. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-660. doi:10.1038/45230
129. Pradhan G, Samson SL, Sun Y. Ghrelin: Much more than a hunger hormone. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(6):619-624. doi:10.1097/MCO.0b013e328365b9be
130. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-326. doi:10.1089/jir.2008.0027
131. Siddiqui JA, Partridge NC. CCL2/monocyte chemoattractant protein 1 and parathyroid hormone action on bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8(MAR):49. doi:10.3389/fendo.2017.00049

132. Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5252-5256. doi:10.1073/pnas.88.12.5252
133. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006;116(1):115-124. doi:10.1172/JCI24335
134. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-1830. doi:10.1172/JCI19451
135. Muoio DM, Newgard CB. Obesity-Related Derangements in Metabolic Regulation. *Annu Rev Biochem*. 2006;75(1):367-401. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142512
136. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879
137. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JGA, Thomazy VA, Evans RM. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93(2):241-252. doi:10.1016/S0092-8674(00)81575-5
138. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, et al. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med*. 2001;7(1):41-47. doi:10.1038/83328
139. Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(1):3-11. doi:10.1515/CCLM.2000.002
140. Armoni M, Harel C, Karnieli E. Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR- γ and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(3):100-107. doi:10.1016/j.tem.2007.02.001
141. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*. 2001;276(41):37731-37734.

doi:10.1074/jbc.R100034200

142. Matysik S, Martin J, Bala M, Scherer M, Schäffler A, Schmitz G. Bile acid signaling after an oral glucose tolerance test. *Chem Phys Lipids*. 2011;164(6):525-529. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.05.003
143. Karrasch T, Leszczak S, Bala M, et al. Short-term Regulation of Visfatin Release in vivo by Oral Lipid Ingestion and in vitro by Fatty Acid Stimulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(02):126-134. doi:10.1055/s-0033-1363262
144. Schmid A, Leszczak S, Ober I, Karrasch T, Schäffler A. Short-term and Divergent Regulation of FGF-19 and FGF-21 during Oral Lipid Tolerance Test but not Oral Glucose Tolerance Test. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015;123(02):88-94. doi:10.1055/s-0034-1395635
145. Scherer M, Gnewuch C, Schmitz G, Liebisch G. Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2009;877(30):3920-3925. doi:10.1016/j.jchromb.2009.09.038
146. Renz H. *Praktische Labordiagnostik: Lehrbuch Zur Laboratoriumsmedizin, Klinischen Chemie Und Hämatologie*. Walter de Gruyter; 2009.
147. Grebe SKG, Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? *Clin Biochem Rev*. 2011;32(1):5-31.
148. Leung KSY, Fong BMW. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: Has its time come? *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(9-10):2289-2301. doi:10.1007/s00216-013-7542-5
149. Dörner K. *Taschenlehrbuch Klinische Chemie Und Hämatologie* . Thieme; 2013.
150. Boja ES, Rodriguez H. The path to clinical proteomics research: Integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J Lab Med*. 2011;31(2):61-71. doi:10.3343/kjlm.2011.31.2.61
151. Wechsler JG *Adipositas: Ursachen und Therapie*. Blackwell Verlag 2002.
152. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol unserer Zeit*. 2007;37(2):120-126.

doi:10.1002/biuz.200610332

153. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-994. doi:10.1101/gr.6.10.986
154. Schmid A, Neumann H, Karrasch T, Liebisch G, Schäffler A. Bile acid metabolome after an oral lipid tolerance test by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *PLoS One.* 2016;11(2):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0148869
155. Lundåsen T, Gälman C, Angelin B, Rudling M. Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J Intern Med.* 2006;260(6):530-536. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01731.x
156. Wirth A. *Adipositas: Epidemiologie . Ätiologie . Folgekrankheiten . Therapie* - Springer Verlag. 2000.
157. Schreuder TCMA, Marsman HA, Lenicek M, et al. The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2010;298(3):G440-G445. doi:10.1152/ajpgi.00322.2009
158. Zhao X, Peter A, Fritsche J, et al. Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *Am J Physiol Metab.* 2009;296(2):E384-E393. doi:10.1152/ajpendo.90748.2008
159. Shaham O, Wei R, Wang TJ, et al. Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Mol Syst Biol.* 2008;4:214. doi:10.1038/msb.2008.50
160. Yang L, Feng F, Paul Fawcett J, Tucker IG. Kinetic and equilibrium studies of bile salt-liposome interactions. *J Liposome Res.* 2015;25(1):58-66. doi:10.3109/08982104.2014.928888
161. Han CY. Update on FXR biology: Promising therapeutic target? *Int J Mol Sci.* 2018;19(7). doi:10.3390/ijms19072069
162. Santiago P, Scheinberg AR, Levy C. Cholestatic liver diseases: new targets, new therapies. *Therap Adv Gastroenterol.* 2018;11. doi:10.1177/1756284818787400

163. Stefaniwsky AB, Tint GS, Speck J, Shefer S, Salen G. Ursodeoxycholic acid treatment of bile reflux gastritis. *Gastroenterology*. 1985;89(5):1000-1004. doi:10.1016/0016-5085(85)90200-8
164. James OFW. Ursodeoxycholic acid treatment for chronic cholestatic liver disease. *J Hepatol*. 1990;11(1):5-8. doi:10.1016/0168-8278(90)90263-Q
165. Cariello M, Piccinin E, Garcia-Irigoyen O, Sabbà C, Moschetta A. Nuclear receptor FXR, bile acids and liver damage: Introducing the progressive familial intrahepatic cholestasis with FXR mutations. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2018;1864(4):1308-1318. doi:10.1016/j.bbadis.2017.09.019
166. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*. 2009;15(14):1677. doi:10.3748/wjg.15.1677
167. Trauner M, Fickert P, Halilbasic E, Moustafa T. Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. In: *Wiener Medizinische Wochenschrift*. Vol 158. ; 2008:542-548. doi:10.1007/s10354-008-0592-1
168. Chiang JYL, Pathak P, Liu H, Donepudi A, Ferrell J, Boehme S. Intestinal Farnesoid X Receptor and Takeda G Protein Couple Receptor 5 Signaling in Metabolic Regulation. *Dig Dis*. 2017;35(3):241-245. doi:10.1159/000450981
169. Duboc H, Taché Y, Hofmann AF. The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Dig Liver Dis*. 2014;46(4):302-312. doi:10.1016/j.dld.2013.10.021
170. Younossi ZM. The epidemiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2018;11(4):92-94. doi:10.1002/cld.710
171. Prentice AM. The emerging epidemic of obesity in developing countries. *Int J Epidemiol*. 2006;35(1):93-99. doi:10.1093/ije/dyi272
172. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The Worldwide Obesity Epidemic. *Obes Res*. 2001;9(S11):228S-233S. doi:10.1038/oby.2001.123
173. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, et al. Definition of Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2004;109(3):433-438. doi:10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6

174. Merk D, Pollinger J, Schubert-Zsilavecz M. Gallensäuren: Viel mehr als nur Lösungsvermittler | *Pharm Ztg*. 2016.
175. Dancygier H. Pathogenese und Therapie der nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen: Von der Fettleber zur Zirrhose. *Dtsch Ärzteblatt*. Jg 103(19). 2006.
176. YOUNOSSI ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(1):2-12. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03710.x
177. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KSL, Cooper GJS. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003;112(1):91-100. doi:10.1172/JCI17797
178. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-845. doi:10.1016/s0016-5085(98)70599-2
179. Longo M, Zatterale F, Naderi J, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9). doi:10.3390/ijms20092358
180. Teodoro JS, Rolo AP, Jarak I, Palmeira CM, Carvalho RA. The bile acid chenodeoxycholic acid directly modulates metabolic pathways in white adipose tissue *in vitro*: insight into how bile acids decrease obesity. *NMR Biomed*. 2016;29(10):1391-1402. doi:10.1002/nbm.3583
181. Shihabudeen MS, Roy D, James J, Thirumurugan K. Chenodeoxycholic acid, an endogenous FXR ligand alters adipokines and reverses insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;414:19-28. doi:10.1016/j.mce.2015.07.012
182. Teodoro JS, Rolo AP, Jarak I, Palmeira CM, Carvalho RA. The bile acid chenodeoxycholic acid directly modulates metabolic pathways in white adipose tissue *in vitro*: insight into how bile acids decrease obesity. *NMR Biomed*. 2016;29(10):1391-1402. doi:10.1002/nbm.3583
183. Mueller M, Thorell A, Claudel T, et al. Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity. *J Hepatol*. 2015;62(6):1398-1404. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.034

184. Schmid A, Schlegel J, Thomalla M, Karrasch T, Schäffler A. Evidence of functional bile acid signaling pathways in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2019;483:1-10. doi:10.1016/j.mce.2018.12.006
185. Schmid A, Schlegel J, Thomalla M, Karrasch T, Schäffler A. Evidence of functional bile acid signaling pathways in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2019;483:1-10. doi:10.1016/j.mce.2018.12.006
186. Yu DD, Sousa KM, Mattern DL, et al. Stereoselective synthesis, biological evaluation, and modeling of novel bile acid-derived G-protein coupled Bile acid receptor 1 (GP-BAR1, TGR5) agonists. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(7):1613-1628. doi:10.1016/j.bmc.2015.01.048
187. Roda A, Pellicciari R, Gioiello A, et al. Semisynthetic Bile Acid FXR and TGR5 Agonists: Physicochemical Properties, Pharmacokinetics, and Metabolism in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;350(1):56-68. doi:10.1124/jpet.114.214650
188. Pellicciari R, Costantino G, Camaioni E, et al. Bile Acid Derivatives as Ligands of the Farnesoid X Receptor. Synthesis, Evaluation, and Structure–Activity Relationship of a Series of Body and Side Chain Modified Analogues of Chenodeoxycholic Acid. *J Med Chem.* 2004;47(18):4559-4569. doi:10.1021/jm049904b

9 Publikationsverzeichnis und Kongressbeiträge

Schmid A, **Neumann H**, Karrasch T, Liebisch G, Schäffler A: Bile acid metabolome after an oral lipid tolerance test by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). PLoS One. 2016;11(2):1–13.¹⁵⁴

Neumann H, Schmid A, Karrasch T, Liebisch G, Schäffler A: Bile acid signaling after an oral lipid tolerance test by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Posterbeitrag
DACH-Tagung der DGE, ÖGES und SGED, München, 26.05.2016 – 28.05.2016

Neumann H, Schmid A, Thomalla M, Karrasch T, Schäffler A: Bile acids in adipocyte biology and adipose tissue inflammation. Posterbeitrag
62. Deutscher Kongress für Endokrinologie, Göttingen, 20.03.2019 – 22.03.2019

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotion niemals zustande gekommen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Professor Dr. med. Schäffler für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Ermöglichung dieser Dissertation. Ich bedanke mich für die ausgezeichnete Unterstützung, die freundliche Hilfe und die Betreuung dieser Arbeit während der gesamten Dissertation. Auch möchte ich mich für die außerordentlich spannende Themenstellung bedanken.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. Karrasch insbesondere für die fachliche Unterstützung und spannenden Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. nat. Liebisch für die Unterstützung bei der Messung der Gallensäuren im Kollektiv, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die Zeit in Regensburg wird mir immer positiv in Erinnerung bleiben

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Schmid für die ausgesprochen gute Betreuung im Labor und die zahlreichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen bedanken, die mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen.

Allen Mitarbeitern der gesamten Arbeitsgruppe, sowie allen Beteiligten meiner Arbeit bin ich sehr dankbar für die gute und kollegiale Zusammenarbeit, zahlreichen Tipps und das freundschaftliche Miteinander. Ein besonderer Dank gilt Kathrin Ebeling und Dr. med. Alexandra Hochberg für tolle Einarbeitung im Labor.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die bedingungslose Unterstützung, die liebevollen Ermutigungen, ihr Verständnis und Interesse während der Anfertigung dieser Doktorarbeit bedanken; allen voran möchte ich meinem Bruder Philipp Neumann, meiner Tante Beate Probst und meinem Mann Jan Belikan danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meinen Eltern, Dr. med. Eva Wiedemann-Neumann und Dr. rer. nat. Michael Neumann, die immer für mich da sind und mich auf meinem Weg begleiten und denen ich diese Arbeit widmen möchte.

12 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the paper.

Der Lebenslauf wurde aus der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the paper.

Der Lebenslauf wurde aus der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the paper.

13 Anhang

Publikation

„Bile Acid Metabolome after an Oral Lipid Tolerance Test by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)“

Andreas Schmid, Hannah Neumann, Thomas Karrasch¹, Gerhard Liebisch, Andreas Schäffler; PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0148869 February 10, 2016

RESEARCH ARTICLE

Bile Acid Metabolome after an Oral Lipid Tolerance Test by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Andreas Schmid^{1*}, Hannah Neumann¹, Thomas Karrasch¹, Gerhard Liebisch², Andreas Schäffler¹

1 Department of Internal Medicine III, Giessen University Hospital, Giessen, Germany, **2** Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Regensburg University Hospital, Regensburg, Germany

* andreas.schmid@innere.med.uni-giessen.de

Abstract

Context

Besides their role in intestinal resorption of lipids, bile acids are regarded as endocrine and metabolic signaling molecules. The detailed profile of bile acid species in peripheral blood after an oral lipid tolerance test (OLTT) is unknown.

Objective

We quantified the regulation of 18 bile acids after OLTT in healthy individuals.

Material and methods

100 volunteers were characterized by anthropometric and laboratory parameters and underwent OLTT. Venous blood was drawn in the fasted state (0 h) and at 2h, 4h, and 6 h after OLTT. Serum concentrations of 18 bile acids were measured by LC-MS/MS.

Results

All of the 6 taurine-conjugated bile acids (TUDCA, THDCA, TCA, TCDCA, TDCA, TLCA) and all of the 6 glycine-conjugated bile acids (GUDCA, GHdCA, GCA, GCDCA, GDCA, GLCA) rose significantly at 2h and remained elevated during OLTT. Of the primary bile acids, CA remained unchanged, whereas CDCA significantly decreased at 4h. Of the secondary bile acids, DCA, UDCA and HDCA were not altered, whereas LCA decreased. There was a significant positive correlation between the intestinal feed-back regulator of bile acid synthesis FGF-19 and bile acids. This correlation seems to depend on all of the six taurine-conjugated bile acids and on GCA, GDCA, and GCDCA. Females and users of hormonal contraception displayed higher levels of taurine-conjugated bile acids.

Conclusions

The novelty of the study is based on the identification of single bile acids during OLTT. LC-MS/MS-based quantification of bile acids in serum provides a reliable tool for future investigation of endocrine and metabolic effects of bile acids.



OPEN ACCESS

Citation: Schmid A, Neumann H, Karrasch T, Liebisch G, Schäffler A (2016) Bile Acid Metabolome after an Oral Lipid Tolerance Test by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). PLoS ONE 11(2): e0148869. doi:10.1371/journal.pone.0148869

Editor: Wendong Huang, Beckman Research Institute of City of Hope, UNITED STATES

Received: September 29, 2015

Accepted: January 24, 2016

Published: February 10, 2016

Copyright: © 2016 Schmid et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Beyond their established role in facilitating the intestinal resorption of lipids and beyond the well-known mechanism of ileal reabsorption and enterohepatic recirculation to the liver, there is increasing data on pleiotropic and systemic effects of bile acids. Thus, bile acids have been shown to affect carbohydrate metabolism, lipid metabolism, immune regulation, growth and differentiation [1–3]. Based on this observation, it is intriguing to speculate that bile acids circulating in the peripheral blood might act as endocrine and metabolic signaling molecules upon food intake. Regarding metabolic function, postprandial regulation of systemic bile acids might be of importance but has been only poorly investigated.

Bile acids exert their effects via two main pathways, the small heterodimeric partner (SHP)-dependent nuclear receptor farnesoid X receptor α (FXR α) pathway and the SHP-independent G-protein-coupled bile acid receptor (TGR5) pathway. Thus, bile acid effects resemble those of hormones. Bile acids act as ligands to FXR α . In the liver, FXR α -activated target gene transcription controls bile acid synthesis, insulin-sensitivity, glycolysis, gluconeogenesis, lipogenesis, carbohydrate metabolism and lipid metabolism via SHP- and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)-dependent mechanisms [4–7].

Fibroblast growth factors (FGFs) represent a family of 22 proteins resembling the function of classical hormones acting on FGF receptors (FGFR1–4). Whereas a dominant role of FXR α -regulated FGF-19 in the control of bile acid metabolism has been widely accepted, a physiological role of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)-regulated FGF-21 in metabolic homeostasis is less clear [8–10]. Tissue-specific metabolic activities of FGF-19 and FGF-21 are modulated by beta Klotho, a homologous single-pass transmembrane protein binding to FGF receptors, and by particular FGF receptor isoform expression [11].

FGF-19 has been regarded as a regulator of hepatic bile acid synthesis [12, 13]. FGF-19 gene transcription and secretion by enterocytes of the ileum is induced by FXR α activation upon bile acid binding. FGF-19 then circulates to the liver via the portal vein and downregulates hepatic bile acid synthesis by a feedback inhibitory circuit [7, 14] through fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4)-mediated transcriptional repression of the enzyme cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), the rate-limiting enzyme in bile acid synthesis [15]. Bile acids as FXR α activators are able to induce hepatic expression and secretion of FGF-21 [16].

Key FXR pathways have been described in multiple animal models and include molecular and pathogenetic implications for hepatic fibrosis, inflammation, atherosclerosis, lipid metabolism, carbohydrate metabolism, endothelial function, thyroid function and bile acid homeostasis [17].

In a metabolic and endocrine point of view, alterations of peripheral blood bile acid concentrations can be investigated by mixed meals given to individuals. However, mixed meals containing proteins, carbohydrates and lipids in different combinations represent a disadvantage when interpreting data. Recently, our group has investigated the isolated effect of carbohydrates on bile acid concentrations by an oral glucose tolerance test [18]. However, there is no single study available investigating the isolated effect of orally ingested lipids on systemic bile acid concentrations in healthy individuals.

Therefore, it was the aim of the present study to investigate by LC-MS/MS

- whether 18 primary, secondary and tertiary conjugated and non-conjugated bile acids are altered in serum of $n = 100$ healthy individuals during an oral lipid tolerance test (OLTT) by using a carbohydrate- and protein-free lipid solution
- whether anthropometric parameters influence the time course of bile acids after OLTT

- whether alterations of the serum bile acid metabolome during OLTT correlates to variations in serum FGF-19 levels

Material and Methods

Study cohort

The present study cohort has been characterized earlier for anthropometric and laboratory parameters as well as for the regulation of adipokines and FGF-19/FGF-21 upon OLTT [19, 20]. Briefly, participants were examined at the University Hospital of Regensburg. 100 healthy volunteers (58 females and 42 males; 66 with normal weight and 34 overweight/obese) gave their written informed consent to the study approved by the ethical committee of the Medical Faculty, University of Regensburg. Exclusion criteria were a positive history of any kind of illness, evidence of acute or chronic infection within 10 days prior to the OLTT, age < 18 years or > 55 years, and any kind of medication (except oral contraceptives). Pregnant and menstruating women were not admitted to the study. Age, BMI, hip circumference, waist circumference, waist/hip ratio, triceps skinfold thickness, and blood pressure were recorded. Patients' history regarding type 2 diabetes and cardiovascular diseases as well as smoking habits or hormonal contraception were documented. Table 1 summarizes the predominant characteristics of the study population as published earlier in detail [19].

Oral lipid tolerance test (OLTT)

OLTT was conducted after an overnight fast of 12 h. During OLTT, the participants had to rest and not to eat or smoke. The ingestion of 500 ml of pure water was allowed over the 6 hours. Venous blood samples were drawn at 0h (fasting), 2h, 4h, and 6 h. Serum was prepared by 10 min of centrifugation at 4000 rotations per min (rpm). As reported recently by our group in detail [19], we used a solution that was free of proteins and carbohydrates. Briefly, the OLTT solution (160 ml; 758.1 kcal; 75 g vegetable fat as triglycerides, 9.2 g fatty acids as pure vegetable oils) comprised the following components: *Component 1*: 150 ml water/fat solution (Calogen^R NUTRICIA-Neutral, Pfrimmer Nutricia, Erlangen, Germany): 75 g vegetable fat as pure triglycerides containing 7.95 g saturated fatty acids, 45.6 g mono-unsaturated fatty acids, 21.45 g polyunsaturated fatty acids, 69 g water, 0.15 g carbohydrates (insignificant trace amount), 675 kcal. *Component 2*: 5 ml (4.6 g; 41.5 kcal) sun flower oil containing 10.2% saturated fatty acids, 26.3% mono-unsaturated fatty acids, and 63.5% poly-unsaturated fatty acids. *Component 3*: 5 ml (4.6g; 41.6 kcal) olive oil containing 14% saturated fatty acids, 78% mono-unsaturated fatty acids, and 8% poly-unsaturated fatty acids.

Quantification of human bile acids in serum by HPLC-MS/MS

Bile acid species were quantified as described previously by LC-MS/MS [21]. Briefly, serum samples were spiked with a mixture of deuterated bile acids as internal standard prior to protein precipitation. Serum extracts were subjected to LC-MS/MS detection in negative ion mode after base-line separation of isobaric species. The LC-MS/MS system consisted of an API 4000 QTrap (AB Sciex, Darmstadt, Germany) that was coupled with electrospray ionization. Chromatographic separation was achieved by an Agilent 1200 HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany). Quantification was achieved using a matrix calibrator generated by standard addition.

Statistical analysis

For calculating mean values \pm standard deviation (\pm SD) or \pm standard error of the mean (\pm SEM), a statistical software package (SPSS 22.0) was used. Mean values were compared by the non-parametric Mann-Whitney U-test for 2 independent samples and the Kruskal-Wallis-H-test for k independent samples. For subgroup analysis of mean values, Bonferroni's correction was performed. Correlation analysis was done by using the Spearman-Rho test for linear variables. A p -value below 0.05 (two tailed) was considered as statistically significant. In the figures, the circles are showing the mean values and the whiskers are giving the 95% confidence interval (CI) of the mean.

Results

Effect of OLTT on main bile acid species

Table 2 gives an overview of the main bile acid species and their systemic response in serum during OLTT. All of the main bile acid species, total/free bile acids, primary/secondary bile acids, and taurine-/glycine-conjugated bile acids show significant alterations during OLTT.

Table 1. Demographic and clinical statistics of the study population.

Study population (n = 100)	
Age (years)	28.1 \pm 7.7 [18–54]
Males n (%)	42 (42)
Females n (%)	58 (58)
<i>Anthropometric parameters</i>	
Mean BMI (kg/m ²)	24.2 \pm 5.0 [14.8–46.1]
BMI < 25 kg/m ² (n, %)	66 (66)
BMI \geq 25 kg/m ² (n, %)	34 (34)
Waist circumference (cm)	83.9 \pm 13.0 [63.0–122.0]
Hip circumference (cm)	99.5 \pm 10.1 [77.0–131.0]
Waist-Hip Ratio	0.84 \pm 0.09 [0.68–1.07]
Skin fold thickness (mm)	11.3 \pm 8.9 [1.0–47.0]
<i>Circulation</i>	
Systolic blood pressure (mm Hg)	121 \pm 15 [90–174]
Diastolic blood pressure (mm Hg)	78 \pm 9 [60–105]
Heart rate (min ⁻¹)	73 \pm 12 [50–105]
<i>Carbohydrate-Metabolism</i>	
Plasma glucose 0h (mg/dl)	74 \pm 13 [40–110]
Plasma insulin 0h (mU/l)	8.9 \pm 5.7 [2.3–33.3]
Plasma C-peptide 0h (μ g/l)	1.3 \pm 0.5 [0.5–3.8]
<i>Lipoprotein-Metabolism</i>	
Total cholesterol 0h (mg/dl)	191 \pm 39 [52–297]
Triglycerides 0h (mg/dl)	120 \pm 50 [24–299]
LDL cholesterol 0h (mg/dl)	111 \pm 33 [21–196]
HDL cholesterol 0h (mg/dl)	60 \pm 17 [23–107]
<i>Inflammation</i>	
CRP (mg/l)	3.9 \pm 3.2 [2.9–27]

Data are presented as means \pm SD (standard deviation) and ranges (square brackets). Demographic data of the present study cohort were under investigation earlier and were reported elsewhere in detail [19, 20]. BMI was not correlated significantly with bile acid or FGF-19 levels. There was a marginal, physiologically irrelevant correlation between age and free bile acid concentration ($p = 0.049$; $r = -0.200$).

doi:10.1371/journal.pone.0148869.t001

Table 2. Main human bile acid species in serum before and during oral lipid tolerance test (OLTT) measured by HPLC-MS/MS.

Bile acid species (nmol/l)	OLTT				p-Value Kruskal-Wallis-H test
	0h	2h	4h	6h	
Total bile acids	3308.720 ± 392.252	9947.405 ± 823.842**	7919.28 ± 795.655**	5516.245 ± 471.777**	p<0.001
Free bile acids	1321.010 ± 235.997	1219.923 ± 171.397	745.489 ± 81.044	648.024 ± 77.715*	p<0.001
Primary bile acids	1989.724 ± 285.873	6266.021 ± 544.104**	4767.497 ± 471.335**	3281.506 ± 295.014**	p<0.001
Secondary bile acids	1318.995 ± 125.796	3681.389 ± 334.222**	3151.780 ± 348.645**	2234.746 ± 200.073**	p<0.001
Taurine-conjugated bile acids	360.374 ± 41.359	1796.152 ± 227.605**	1573.599 ± 284.211**	1023.587 ± 169.335**	p<0.001
Glycine-conjugated bile acids	1627.333 ± 191.093	6931.332 ± 608.544**	5600.190 ± 564.251**	3844.633 ± 341.230**	p<0.001

Data are given as mean concentrations ± SEM (standard error of the mean) in nmol/l. For overall correlation analysis of data, the non-parametric Kruskal-Wallis-H test was applied. For direct comparison of mean bile acid levels from 0h to 2h, 4h and 6h respectively, the non-parametric Mann-Whitney U-Test was used (* p = 0.001; ** p<0.001). Since 4 subgroups (points of time) were compared, significance is reached at a p-value < 0.0125 due to Bonferroni's correction.

doi:10.1371/journal.pone.0148869.t002

Total bile acids increased (~3fold) with a maximum at 2h and remained elevated at 4h and 6h when compared to the fasted state. In contrast, free bile acids decreased significantly (~50%) at 6h after OLTT. Both, primary and secondary bile acid species significantly increased (~3-fold) with a maximum at 2h and remained at higher levels when compared to the fasted state. Similarly, the taurine- and glycine-conjugated bile acids significantly increased (~4 to 5-fold) with a maximum level at 2h and also remained at a higher plateau when compared to 0h.

Quantitative profiling of 18 human single bile acids during OLTT

Since changes in main bile acid species do not allow a deeper insight into bile acid physiology and potential endocrine effects of circulating single/specific bile acids after oral lipid ingestion, 18 bile acids were quantified at all points of time (0h, 2h, 4h, 6h) during OLTT in all participating individuals (n = 100). [Table 3](#) summarizes the individual changes of each of the 18 bile acids during OLTT.

Taurine-conjugated bile acids: All of the 6 taurine-conjugated bile acids (TUDCA, THDCA, TCA, TCDCA, TDCA, TLCA) rose significantly (~5-fold) and early (at 2h) and remained at higher levels until the end of the OLTT.

Glycine-conjugated bile acids: All of the 6 glycine-conjugated bile acids (GUDCA, GHDCa, GCA, GCDCA, GDCA, GLCA) rose significantly (~3 to 4-fold) and early (at 2h) and remained at higher levels until the end of the OLTT.

Primary bile acids: Of the two primary bile acids (CA and CDCA), CA remained unchanged during OLTT, whereas CDCA significantly decreased at 4h.

Secondary bile acids: Of the secondary bile acids, DCA and HDCA were not significantly altered during OLTT. LCA decreased during OLTT in a stepwise manner. However, significance was only reached at 2h when compared to 0h.

Tertiary bile acids: Of the tertiary bile acids, UDCA was not altered significantly.

[Fig 1](#) exemplarily depicts the time course of total bile acids, taurine- and glycine-conjugated bile acids as well as CDCA.

Correlation analysis of postprandial FGF-19 and FGF-21 serum concentrations with bile acid species after oral lipid ingestion

[Table 4](#) summarizes the results of the correlation analysis of postprandial FGF-19 concentrations with bile acid species. Our previous work [20] demonstrated a significant (p = 0.006)

Table 3. Profile of 18 human bile acid species in serum before and during oral lipid tolerance test (OLTT) measured by HPLC-MS/MS.

Bile acid species (nmol/l)	OLTT 0h	OLTT 2h	OLTT 4h	OLTT 6h	p-Value Kruskal-Wallis test
Primary bile acids					
Non-conjugated					
CA	873.479 ± 204.050	898.947 ± 424.138	465.679 ± 148.421	481.794 ± 177.428	0.2542
CDCA	569.232 ± 132.654	453.927 ± 72.115	258.656 ± 45.992*	261.614 ± 50.172	0.001
Taurine-conjugated					
TCA	69.491 ± 11.138	353.543 ± 58.511**	291.204 ± 66.445**	192.564 ± 41.567**	<0.001
TCDCA	188.461 ± 20.865	922.491 ± 104.140**	787.482 ± 114.169**	531.767 ± 74.298**	<0.001
Glycine-conjugated					
GCA	321.045 ± 52.853	1370.278 ± 140.969**	995.840 ± 111.553**	712.917 ± 85.597**	<0.001
GCDCA	741.949 ± 92.486	3099.537 ± 273.912**	2474.421 ± 238.492**	1672.319 ± 138.267**	<0.001
Secondary bile acids					
Non-conjugated					
DCA	403.422 ± 36.961	534.504 ± 54.941	400.323 ± 40.126	341.823 ± 30.930	0.065
HDCA	51.293 ± 11.781	50.838 ± 4.923	42.022 ± 4.159	36.430 ± 3.067	0.088
LCA	142.273 ± 53.182	128.878 ± 18.523*	103.149 ± 17.075	82.148 ± 11.409	0.004
Taurine-conjugated					
TDCA	80.859 ± 11.849	428.328 ± 71.909**	412.929 ± 103.339**	241.241 ± 54.809**	<0.001
THDCA	5.040 ± 0.893	22.608 ± 4.483**	21.426 ± 4.720**	13.582 ± 2.259**	<0.001
TLCA	7.595 ± 1.339	34.069 ± 6.728**	32.182 ± 7.081**	20.204 ± 3.360**	<0.001
Glycine-conjugated					
GDCA	353.597 ± 46.483	1438.036 ± 145.168**	1193.556 ± 143.518**	787.910 ± 85.000**	<0.001
GHDCA	126.382 ± 17.910	378.963 ± 61.405**	356.581 ± 63.921**	268.137 ± 38.275**	<0.001
GLCA	162.795 ± 25.813	521.973 ± 87.772**	489.985 ± 91.349**	363.635 ± 54.707**	<0.001
Tertiary bile acids					
Non-conjugated					
UDCA	142.273 ± 53.182	128.878 ± 18.523	103.149 ± 17.075	82.148 ± 11.409	0.195
Taurine-conjugated					
TUDCA	7.595 ± 1.339	34.069 ± 6.728**	32.182 ± 7.081**	20.204 ± 3.360**	<0.001
Glycine-conjugated					
GUDCA	162.795 ± 25.813	521.973 ± 87.772**	489.985 ± 91.349**	363.635 ± 54.707**	<0.001

Data are given as mean concentrations ± SEM (standard error of the mean) in nmol/l. For overall correlation analysis of data, the non-parametric Kruskal-Wallis-H test was applied. For direct comparison of mean bile acid levels from 0h to 2h, 4h, and 6h respectively, the non-parametric Mann-Whitney U-Test was used (* p<0.01; ** p<0.001). Since 4 subgroups (timepoints) were compared, significance is reached at a p-value < 0.0125 due to Bonferroni's correction. Primary bile acids: CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid. Secondary bile acids: DCA, deoxycholic acid, HDCA, hyodeoxycholic acid. LCA, lithocholic acid; Tertiary bile acids: UDCA, ursodeoxycholic acid; Taurine-conjugated bile acids: TCA, taurocholic acid; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid; TDCA, taurodeoxycholic acid; TLCA, tauroolithocholic acid; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid; THDCA, taurohyodeoxycholic acid. Glycine-conjugated bile acids: GCA, glycocholic acid; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; GDCA, glycodeoxycholic acid; GLCA, glycolithocholic acid; GUDCA, glycoursodeoxycholic acid; GHDCA, glycohyodeoxycholic acid.

doi:10.1371/journal.pone.0148869.t003

increase of triglycerides between 2h and 4h (Table 1) and a significant rise of FGF-19 at 4h during OLTT in this cohort [20]. In detail, basal FGF-19 levels were 105 ± 81 pg/ml and rose up to 141 ± 102 pg/ml (p = 0.006) at 4 h [20]. In comparison, the maximum rise of bile acids occurred early at 2h during OLTT and the 1–2h delay between the postprandial rise of bile acids and FGF-19 is in accordance with data from the literature [18, 22]. However, this time

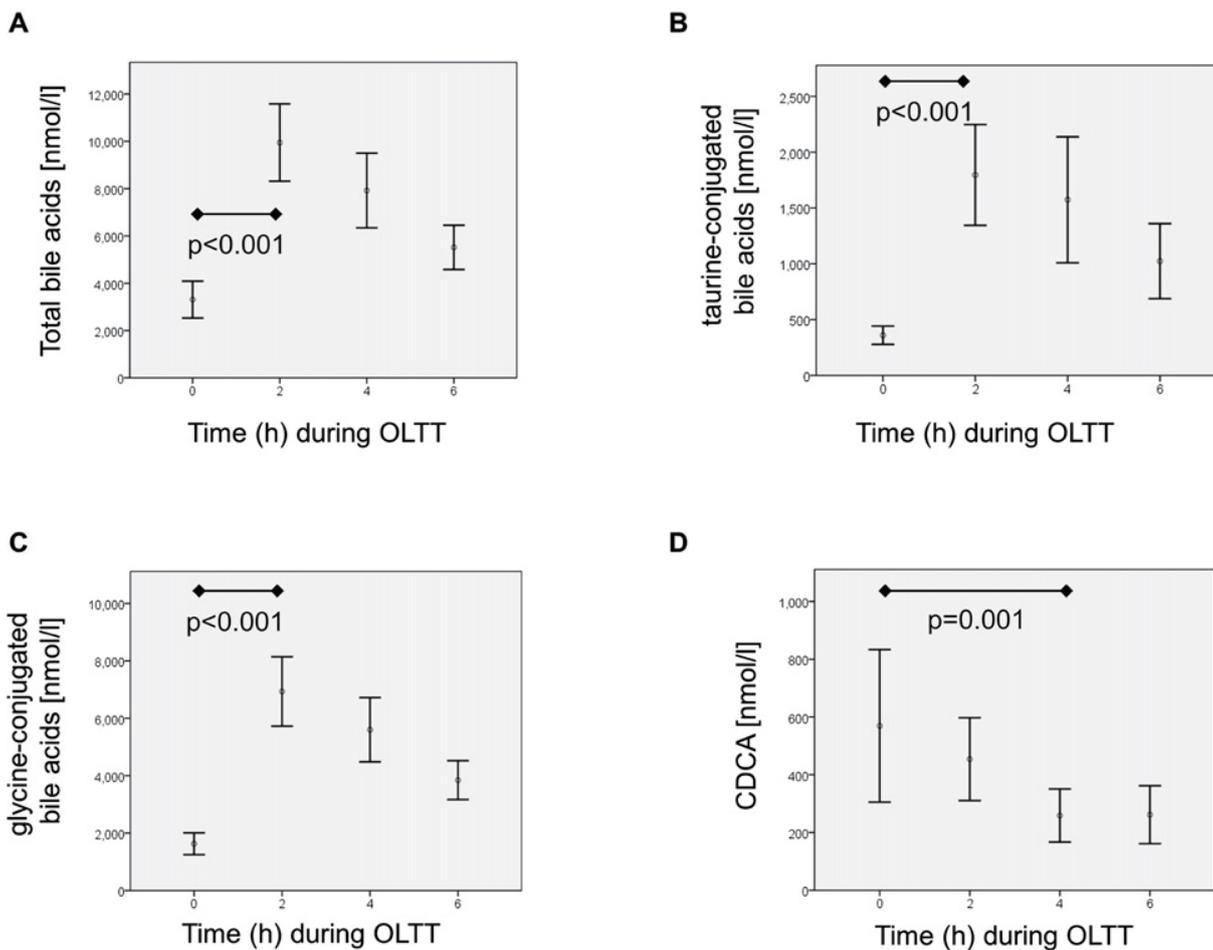


Fig 1. Time-dependent variations of bile acids during an oral lipid tolerance test (OLTT) are shown in healthy individuals ($n = 100$) for total bile acids (A), taurine-conjugated bile acids (B), glycine-conjugated bile acids (C), and chenodeoxycholic acid (D). The bars are showing the median values and the whiskers are giving the 95% confidence interval (CI) of the mean. CDCA, chenodeoxycholic acid.

doi:10.1371/journal.pone.0148869.g001

kinetics has not yet been proved for a pure lipid tolerance test devoid of carbohydrates and proteins.

In the present study, we could detect significant positive correlations between FGF-19 levels and bile acids which were most striking at 6h after lipid ingestion. With respect to main bile acid species, there was a highly significant and positive correlation between FGF-19 levels and total bile acids, free bile acids, primary bile acids, secondary bile acids, taurine-conjugated bile acids and glycine-conjugated bile acids. Since it was our aim to identify those bile acids that are mainly responsible for these class effects, correlation analysis was performed for each of the 18 bile acids measured. No significant correlations were found for GUDCA, UDCA, GHDCA, HDCA, CA, CDCA, GLCA, and LCA. The positive correlation between FGF-19 and bile acids was strongest for the taurine-conjugated bile acids ($r = +0.8$). All of the six taurine-conjugated bile acids TUDCA, THDCA, TCA, TCDCA, TDCA, and TLCA showed this positive correlation with FGF-19. The correlation between FGF-19 and the glycine-conjugated bile acids is caused only by GCA, GDCA, and GCDCA, since GUDCA, GHDCA, and GLCA had no effect. For interested readers, the correlation analysis of FGF-19 with bile acid species is presented for gender subgroups and for contraceptive users/non-users under *Online Supporting Information*

Table 4. Correlation analysis of postprandial FGF-19 serum concentrations with bile acid species.

		p-value	correlation coefficient r
	Bile acid species		
FGF-19	total bile acids	<0.001	+ 0.41
FGF-19	free bile acids	0.012	+ 0.25
FGF-19	primary bile acids	0.001	+ 0.34
FGF-19	secondary bile acids	<0.001	+ 0.7
FGF-19	taurine-conjugated bile acids	<0.001	+ 0.8
FGF-19	glycine-conjugated bile acids	0.001	+ 0.34
	Single bile acids		
FGF-19	TUDCA	0.012	+ 0.25
FGF-19	THDCA	0.012	+ 0.25
FGF-19	TCA	0.024	+ 0.23
FGF-19	GCA	0.026	+ 0.23
FGF-19	TCDCA	0.002	+ 0.30
FGF-19	GCDCA	0.002	+ 0.31
FGF-19	TDCA	<0.001	+ 0.4
FGF-19	GDCA	<0.001	+ 0.37
FGF-19	DCA	0.003	+ 0.3
FGF-19	TLCA	0.004	+ 0.29

Levels of FGF-19 (pg/ml) drawn at 6h after oral lipid ingestion were correlated with bile acid species (nmol/ml) at 6h by the Spearman-Rho test. No significant correlations were found for GUDCA, UDCA, GHDCA, HDCA, CA, CDCA, GLCA, and LCA (data not shown).

doi:10.1371/journal.pone.0148869.t004

(S1 and S2 Tables). However, subgroups might be too small for profound or extensive interpretation.

In our previous study [20], FGF-21 levels were shown to decrease significantly and transiently during OLTT. In detail [20], basal FGF-21 concentrations decreased from 158.8 ± 203.6 pg/ml at 0h down to 127.6 ± 184.4 pg/ml at 2h ($p = 0.03$). We now retrieved these data and calculated a correlation analysis for FGF-21 and bile acids. In contrast to FGF-19 mentioned above, FGF-21 was negatively correlated to some of the bile acids. In detail, FGF-21 concentrations at 6h were significantly and negatively correlated with taurine-conjugated bile acids in total ($p = 0.017$; $r = -0.24$) and with TCA ($p = 0.002$; $r = -0.3$), TDCA ($p = 0.014$; $r = -0.25$), and TLCA ($p = 0.04$; $r = -0.21$).

Effects of gender and BMI on postprandial bile acid concentration

Subgroup analysis displayed differential effects of sex on postprandial bile acid levels at 6h after OLTT. Table 5 summarizes the effects of gender on postprandial bile acids. Taurine-conjugated bile acids in general were significantly higher in females when compared to males (~2.5-fold). In detail, all of the taurine-conjugated bile acid species were significantly higher (~1.5 to 3-fold) in females when compared to males. Since bile acids were not significantly different between males and females at baseline (data not shown), these sex differences are not due to differences in overall levels but possibly to differences in sensitivity to lipid challenge. None of the glycine-conjugated bile acids was gender-dependent. UDCA was the only bile acid identified with significantly lower levels in females when compared to males. The remaining bile acids were not significantly different between females and males. When individuals were subdivided into lean subjects ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$) and overweight/obese subjects ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$),

Table 5. Effects of gender and of hormonal contraception on bile acid concentrations.

Bile acids (nmol/l)	females n = 58	males n = 42	Significance p-value
Taurine-conjugated bile acids (all)	1374.403 ± 278.042	539.126 ± 81.016	0.001
TUDCA	23.505 ± 4.527	15.645 ± 4.968	0.023
THDCA	15.923 ± 3.059	10.405 ± 3.312	0.016
TCA	270.666 ± 69.171	84.71 ± 16.072	0.001
TCDCA	680.584 ± 119.578	326.257 ± 50.081	0.002
TDCA	351.110 ± 91.460	89.517 ± 15.582	<0.001
TLCA	33.470 ± 5.592	13.562 ± 1.518	0.002
Bile acid	Contraception (females) Yes (n = 38)	Contraception(females) No (n = 20)	Significance p-value
Taurine-conjugated bile acids (all)	1780.774 ± 405.625	602.300 ± 126.166	0.001
TUDCA	25.711 ± 3.999	19.315 ± 10.848	0.003
THDCA	17.147 ± 2.667	13.474 ± 7.592	0.005
TCA	356.897 ± 102.082	106.825 ± 30.228	0.003
TCDCA	860.032 ± 172.146	33.635 ± 73.599	0.002
TDCA	480.629 ± 134.704	105.025 ± 27.824	<0.001
TLCA	40.363 ± 7.903	19.684 ± 4.402	0.046

Bile acids (nmol/l) with significantly different concentrations between females/males and users/non-users of hormonal contraception at 6h during OLTT are summarized. Mean values ± SEM are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0148869.t005

mean values of all bile acids measured were not significantly different (data not shown). Importantly, when taurine-conjugated bile acid levels of males were compared to those of women not using contraceptives, we could not detect significant changes between genders. Thus, the effect of hormonal contraception was further investigated.

Effects of hormonal contraception on postprandial bile acid concentration

Users of hormonal contraception displayed differential effects regarding their postprandial bile acid levels at 6h after OLTT. [Table 5](#) summarizes the effects of hormonal contraception on postprandial bile acids. Taurine-conjugated bile acids were higher in users when compared to non-users (~3-fold). In detail, all of the taurine-conjugated bile acid species were affected by contraceptives and showed significantly higher concentrations. Since taurine-conjugated bile acids were also slightly higher (p = 0.026; data not shown) at baseline in users vs. non-users, the marked differences at 6h after lipid ingestion might be due to differences in overall levels as well as to differences in sensitivity to lipid challenge. CDCA was the only bile acid identified whose concentrations were significantly lower under hormonal contraception. The remaining bile acids were not significantly different between users and non-users of hormonal contraception (data not shown).

Discussion

The present study was conducted in order to gain systematic insight into changes of serum bile acids and their regulator proteins FGF-19 and FGF-21 during OLTT in healthy individuals. Since the uptake of bile acids by the liver via the enterohepatic circulation is highly efficient, nano/micro-molar fractions enter the systemic circulation and might exert yet unknown endocrine and metabolic effects on organs other than the liver. Systemic bile acid concentrations

might result from a passive spillover by the enterohepatic circulation (portal vein) or from direct hepatic release via the hepatic veins. The latter is a matter of speculation but would offer the fascinating hypothesis of bile acids as hepatokines exerting multi-organ systemic effects. For example, molecular studies have shown that some bile acid species are able to interact with lipid bilayers at sub-micellar concentrations [23]. Thus, disturbance of liposomal membranes by bile acids might affect a plethora of ligand-receptor interactions and subsequent signal transduction as well as intracellular protein trafficking.

The novelty of the present study is based on the identification of single bile acids that are responsible for the systemic alterations of main bile acid species such as total/free bile acids, primary/secondary bile acids, and taurine-/glycine-conjugated bile acids during OLTT. This was only possible by applying a sophisticated technical approach for the measurement of 18 different human bile acids. HPLC-MS/MS is suitable for rapid and precise quantification of human bile acids, as shown earlier by our group [18]. Whereas all of the main bile acid species showed alterations during OLTT, it is now possible to detect single bile acids that cause these species effects and to exclude single bile acids not contributing to the postprandial systemic alterations. Moreover, the present study including $n = 100$ participants is large enough to be statistically robust against outliers when compared to similar studies with less participants [24–26].

SHP-independent bile acid signaling can be investigated by targeting FGF-19. Our group and others have shown that serum levels of FGF-19 rise significantly 4h after oral lipid ingestion [20] and this response is blunted in patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance [24]. We observed a rapid onset increase of bile acids after 2h during OLTT, similar to a bile acid increase at 1h after a glucose challenge [18]. After this increase, bile acids remained significantly elevated up to 6h when compared to the fasted state. The postprandial increase of bile acids is followed by a rise of FGF-19 after 90–120 min [22] in normal subjects. Since we could recently describe a significant rise of FGF-19 at 4h after OLTT in the presented cohort of healthy volunteers [20], we retrieved these data and tested for a possible correlation of basal and postprandial FGF-19 levels with each of the bile acids measured. Whereas basal FGF-19 and bile acid concentrations showed no correlation in the fasted state, we were able to describe significant positive correlations of postprandial (6h) FGF-19 levels with a distinct pattern of bile acids. A widely accepted mechanism for the postprandial FGF-19 rise in plasma is based on the release of FGF-19 from enterocytes following bile acid binding to FXR α and its activation. Since FGF-19 plasma levels rise significantly later (after 4h upon OLTT) when compared to plasma bile acids (after 2h) [20, 22], the positive correlation between FGF-19 and postprandial bile acids might indicate the existence of an alternative route of FGF-19 secretion upon oral lipid uptake. It currently remains unclear why only a distinct type of bile acids is correlated postprandially with FGF-19 whereas others are not. Future studies have to address this interesting question. Since fatty liver disease and insulin resistance are known factors [24] that are able to blunt FGF-19 secretion, an individual metabolic constellation might affect the correlation between bile acids and FGF-19 release.

In contrast, FGF-21 concentrations significantly declined during OLTT and there was a negative correlation between FGF-21 and taurine-conjugated bile acids during OLTT. These results obtained *in vivo* challenge the results obtained in primary hepatocytes *in vitro* [16], where a bile acid-induced and FXR α -dependent secretion of FGF-21 has been reported. The exact mechanism and the physiological background how and why bile acids change after OLTT remain unclear. There are two principle mechanisms for a postprandial increase of systemic bile acids, a spillover phenomenon from the intestinal circulation to the systemic circulation or a direct release by the liver. Since FGF-19 is upregulated typically late after 4h during OLTT, bile acids are upregulated relatively fast after 2h. This might argue against a spillover

phenomenon from the intestinal circulation and favors a direct release by the liver upon oral lipid uptake. The latter potential mechanism might provide the potential basis for a role of bile acids as “hepatokines” that has to be investigated by further mechanistic studies. The observed decrease of free bile acid concentrations contrary to conjugated bile acid species suggests an elevated turnover rate of free bile acid conjugation with glycine or taurine, respectively, as a consequence of oral lipid ingestion. As discussed earlier by Matysik et al. investigating bile acid profiles during an oral glucose tolerance test [18], postprandial FXR α activation by bile acids might induce a rise in bile acid amidation rate. However, since neither the rate of bile acid resorption from the small intestine nor of hepatic bile acid synthesis was quantified in the presented study, no proof of principle can be given for this speculation.

Not all the bile acid species measured activate the receptors FXR and TGR5 with the same potency. This fact complicates the interpretation of data implying that different bile acids patterns might have different biological impact according to receptor activation and signaling.

Taken together, after a pure lipid ingestion the time kinetics of bile acids, triglycerides and FGF-19 in healthy individuals could be clarified by the present study. Bile acids are upregulated very fast after 2h of ingestion. This rise in bile acids precedes the increase of triglycerides (Table 1) which typically occurs between 2h and 4h. After 4h, FGF-19 becomes upregulated. Whereas there is an established and unquestioned role of the enterohepatic circulation as a route for bile acids and FGF-19, future studies have to investigate the exact routes of bile acids, FGF-19, and FGF-21 from the intestine and/or from the liver into the systemic circulation. It would be of interest to conduct studies on a cellular level investigating whether postprandially upregulated bile acids and FGF-19 differentially regulate the activation of beta Klotho in a given metabolic context such as hyperlipidemia or hyperglycemia.

Summary

- Total bile acids as well as taurine- and glycine-conjugated bile acids show an early (2h) rise after OLTT and remain elevated up to 6h. This bile acid rise in peripheral blood precedes the postprandial rise of FGF-19 seen at 4h and the postprandial rise of triglycerides seen between 2h to 4h.
- Of the primary bile acids, CA remained unchanged after OLTT, whereas CDCA decreased at 4h.
- Of the secondary bile acids, LCA decreased and the others remained unchanged.
- There is a significant and positive correlation between FGF-19 and several bile acids. The strongest correlation was documented for taurine-conjugated bile acids.
- There is a significant and negative correlation between FGF-21 and taurine-conjugated bile acids.
- Higher levels of taurine-conjugated bile acids in females are caused by hormonal contraception whereas glycine-conjugated bile acids were not affected by gender or contraception

Conclusions

To our knowledge, this is the first study quantifying 18 different bile acid species in peripheral blood of healthy individuals by LC-MS/MS after oral lipid ingestion by using a solution free of carbohydrates and proteins. Moreover, the novelty of the present study lies on the identification of single bile acids that are responsible for the systemic alterations of main bile acid

species. LC-MS/MS-based quantification of bile acids in peripheral blood serum provides a reliable tool for future investigation of endocrine and metabolic effects of circulating bile acids beyond their function in enterohepatic circulation and liver physiology.

Supporting Information

S1 Table. Correlation analysis of postprandial FGF-19 serum concentrations with bile acid species in gender subgroups.

(DOC)

S2 Table. Correlation analysis of postprandial FGF-19 serum concentrations with bile acid species in subgroups of hormonal contraception.

(DOC)

Acknowledgments

The previous work of I. Ober and S. Leszczak is highly appreciated.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ASchmid TK ASchäffler. Performed the experiments: HN GL. Analyzed the data: ASchmid ASchäffler. Contributed reagents/materials/analysis tools: GL ASchäffler. Wrote the paper: ASchmid ASchäffler.

References

1. Fiorucci S, Cipriani S, Baldelli F, Mencarelli A. Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders. *Progress in lipid research*. 2010; 49(2):171–85. doi: [10.1016/j.plipres.2009.11.001](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.11.001) PMID: [19932133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19932133/).
2. Fiorucci S, Cipriani S, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Baldelli F. Counter-regulatory role of bile acid activated receptors in immunity and inflammation. *Current molecular medicine*. 2010; 10(6):579–95. PMID: [20642438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20642438/).
3. Fiorucci S, Mencarelli A, Distrutti E, Palladino G, Cipriani S. Targeting farnesoid-X-receptor: from medicinal chemistry to disease treatment. *Curr Med Chem*. 2010; 17(2):139–59. PMID: [19941473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19941473/).
4. Prawitt J, Staels B. Bile acid sequestrants: glucose-lowering mechanisms. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2010; 8 Suppl 1:S3–8. doi: [10.1089/met.2010.0096](https://doi.org/10.1089/met.2010.0096) PMID: [20977365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20977365/).
5. Stroeve JH, Brufau G, Stellaard F, Gonzalez FJ, Staels B, Kuipers F. Intestinal FXR-mediated FGF15 production contributes to diurnal control of hepatic bile acid synthesis in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010; 90(10):1457–67. doi: [10.1038/labinvest.2010.107](https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.107) PMID: [20531290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20531290/).
6. Staels B, Handelsman Y, Fonseca V. Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. *Current diabetes reports*. 2010; 10(1):70–7. doi: [10.1007/s11892-009-0087-5](https://doi.org/10.1007/s11892-009-0087-5) PMID: [20425070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20425070/); PubMed Central PMCID: [PMC2821506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2821506/).
7. Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes & development*. 2003; 17(13):1581–91. doi: [10.1101/gad.1083503](https://doi.org/10.1101/gad.1083503) PMID: [12815072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12815072/); PubMed Central PMCID: [PMC196131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC196131/).
8. Angelin B, Larsson TE, Rudling M. Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators—a critical appraisal. *Cell metabolism*. 2012; 16(6):693–705. doi: [10.1016/j.cmet.2012.11.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.001) PMID: [23217254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23217254/).
9. Kharitonov A. FGFs and metabolism. *Current opinion in pharmacology*. 2009; 9(6):805–10. doi: [10.1016/j.coph.2009.07.001](https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.001) PMID: [19683963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19683963/).
10. Cicione C, Degirolamo C, Moschetta A. Emerging role of fibroblast growth factors 15/19 and 21 as metabolic integrators in the liver. *Hepatology*. 2012; 56(6):2404–11. doi: [10.1002/hep.25929](https://doi.org/10.1002/hep.25929) PMID: [22753116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22753116/).
11. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of

- FGF19 and FGF21. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282(37):26687–95. doi: [10.1074/jbc.M704165200](https://doi.org/10.1074/jbc.M704165200) PMID: [17623664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17623664/); PubMed Central PMCID: PMC2496965.
12. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2009; 8(3):235–53. doi: [10.1038/nrd2792](https://doi.org/10.1038/nrd2792) PMID: [19247306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19247306/); PubMed Central PMCID: PMC3684054.
 13. Jones S. Mini-review: endocrine actions of fibroblast growth factor 19. *Molecular pharmaceuticals*. 2008; 5(1):42–8. doi: [10.1021/mp700105z](https://doi.org/10.1021/mp700105z) PMID: [18179175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18179175/).
 14. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell metabolism*. 2005; 2(4):217–25. doi: [10.1016/j.cmet.2005.09.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001) PMID: [16213224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16213224/).
 15. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular cell*. 2000; 6(3):517–26. PMID: [11030332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11030332/).
 16. Cyphert HA, Ge X, Kohan AB, Salati LM, Zhang Y, Hillgartner FB. Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(30):25123–38. doi: [10.1074/jbc.M112.375907](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375907) PMID: [22661717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22661717/); PubMed Central PMCID: PMC3408207.
 17. Adorini L, Pruzanski M, Shapiro D. Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug discovery today*. 2012; 17(17–18):988–97. doi: [10.1016/j.drudis.2012.05.012](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.05.012) PMID: [22652341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22652341/).
 18. Matysik S, Martin J, Bala M, Scherer M, Schaffler A, Schmitz G. Bile acid signaling after an oral glucose tolerance test. *Chemistry and physics of lipids*. 2011; 164(6):525–9. doi: [10.1016/j.chemphyslip.2011.05.003](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.05.003) PMID: [21679700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21679700/).
 19. Karrasch T, Leszczak S, Bala M, Ober I, Martin J, Schmid A, et al. Short-term regulation of Visfatin release in vivo by oral lipid ingestion and in vitro by fatty acid stimulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014; 122(2):126–34. doi: [10.1055/s-0033-1363262](https://doi.org/10.1055/s-0033-1363262) PMID: [24554513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24554513/).
 20. Schmid A, Leszczak S, Ober I, Karrasch T, Schaffler A. Short-term and divergent regulation of FGF-19 and FGF-21 during oral lipid tolerance test but not oral glucose tolerance test. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015; 123(2):88–94. doi: [10.1055/s-0034-1395635](https://doi.org/10.1055/s-0034-1395635) PMID: [25654672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25654672/).
 21. Scherer M, Gnewuch C, Schmitz G, Liebisch G. Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2009; 877(30):3920–5. doi: [10.1016/j.jchromb.2009.09.038](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.09.038) PMID: [19819765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19819765/).
 22. Lundasen T, Galman C, Angelin B, Rudling M. Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *Journal of internal medicine*. 2006; 260(6):530–6. doi: [10.1111/j.1365-2796.2006.01731.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01731.x) PMID: [17116003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17116003/).
 23. Yang L, Feng F, Fawcett JP, Tucker IG. Kinetic and equilibrium studies of bile salt-liposome interactions. *Journal of liposome research*. 2015; 25(1):58–66. doi: [10.3109/08982104.2014.928888](https://doi.org/10.3109/08982104.2014.928888) PMID: [24960448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24960448/).
 24. Schreuder TC, Marsman HA, Lenicek M, van Werven JR, Nederveen AJ, Jansen PL, et al. The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2010; 298(3):G440–5. doi: [10.1152/ajpgi.00322.2009](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00322.2009) PMID: [20093562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20093562/).
 25. Zhao X, Peter A, Fritsche J, Elcnerova M, Fritsche A, Haring HU, et al. Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009; 296(2):E384–93. doi: [10.1152/ajpendo.90748.2008](https://doi.org/10.1152/ajpendo.90748.2008) PMID: [19066319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19066319/).
 26. Shaham O, Wei R, Wang TJ, Ricciardi C, Lewis GD, Vasam RS, et al. Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Molecular systems biology*. 2008; 4:214. doi: [10.1038/msb.2008.50](https://doi.org/10.1038/msb.2008.50) PMID: [18682704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18682704/); PubMed Central PMCID: PMC2538910.