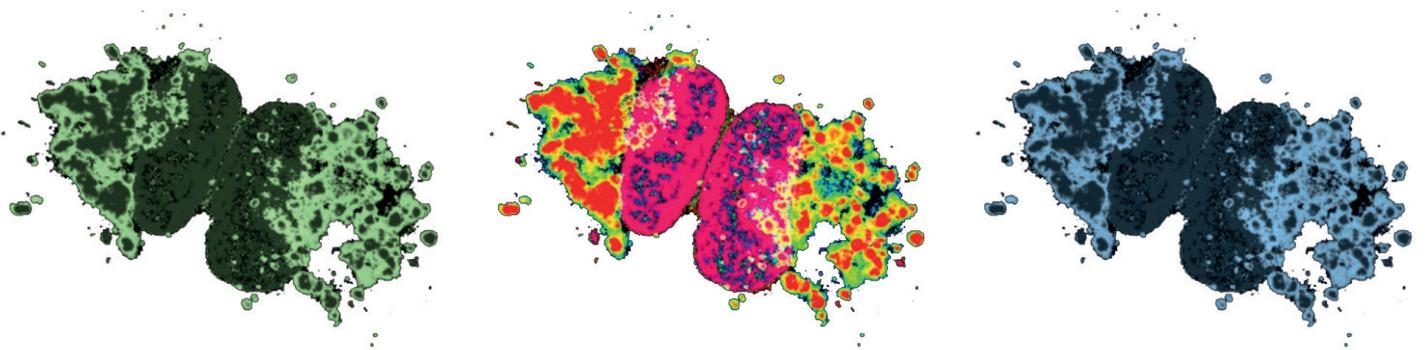


MATTHIAS FRANZ WILHELM HOLTEMEYER

Untersuchung des Gallensäurestoffwechsels der *Slc10a5* Knockout-Maus

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

© 2020 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

Foto Titelseite

© M. Holtemeyer

ISBN 978-3-86345-541-5

1. Auflage 2020

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvg.de
www.dvg.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

Untersuchung des Gallensäurestoffwechsels der *Slc10a5* Knockout-Maus

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Matthias Franz Wilhelm Holtemeyer
Tierarzt aus Kempen am Niederrhein

Gießen 2020

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. J. Geyer

Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation: 02.06.2020

- meinen Eltern -

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Solute Carrier Familie 10	1
1.2 SLC10A5	3
1.3 Gallensäuren	4
1.4 Gallensäuresynthese	6
1.5 Konjugation von Gallensäuren	7
1.6 Gallensäuren und das Mikrobiom.....	10
1.7 Regulation von Gallensäuren.....	11
1.8 Der enterohepatische Kreislauf	13
1.9 Die Struktur der Zelle	14
1.10 Toxizität von Gallensäuren.....	19
1.11 Zielsetzung	20
2 Material	22
2.1 Molekularbiologische Materialien	22
2.1.1 PCR-Primer	22
2.1.2 Vektoren.....	22
2.1.3 Enzyme	25
2.1.4 Bakterienstämme.....	25
2.1.5 Quantitative <i>real-time PCR</i>	26
2.1.6 Gelelektrophorese	27
2.1.7 Kommerzielle Kits und Reagenzien für die Molekularbiologie	27
2.1.8 Puffer und Medien	28
2.2 Zellkultur	28
2.3 Mikroskopische Verfahren.....	31
2.3.1 Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen	31
2.3.2 Immunfluoreszenz an Cryoschnitten.....	31
2.3.3 Live Cell Imaging.....	34
2.4 Transportmessungen	34
2.4.1 Transportmessungen im 24-Well Format.....	35
2.4.2 Vesikeltransport.....	36
2.5 Versuchstiere.....	37
2.6 Reagenzien.....	38
2.7 Verbrauchsmaterialien	39

2.8	Geräte	40
2.9	Programme und Tools.....	43
3	Methoden.....	44
3.1	Allgemeine Methoden der Molekularbiologie.....	44
3.1.1	Isolation von RNA.....	44
3.1.2	Synthese von cDNA.....	45
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	46
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
3.1.5	Mutagenese PCR	47
3.1.6	<i>Real-Time PCR</i>	47
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	49
3.1.8	Gel-Aufreinigung von DNA-Fragmenten	49
3.1.9	DNA-Klonierung.....	50
3.1.10	Plasmidpräparationen.....	51
3.2	Zellkultur	53
3.3	Radioaktive Transportmessungen.....	56
3.3.1	Transportmessungen in Membranvesikeln	56
3.3.2	Transportmessungen in HEK293 Zellen	58
3.4	Mikroskopie.....	59
3.4.1	Immunfluoreszenzfärbungen in der Zellkultur	59
3.4.2	Mikroskopie von lebenden Zellen.....	60
3.4.3	Gewebelokalisation von SLC10A5.....	62
3.5	In-vivo Versuche	66
3.5.1	Die <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus	66
3.5.2	Speed Congenics gestützte Rückkreuzung	66
3.5.3	Analyse nicht rekombinierter Genombereiche.....	67
3.5.4	Genotypisierung der Knockout-Maus-Linien	68
3.5.5	Die Stoffwechselbilanz der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus.....	69
3.5.6	Berechnung des Hydrophobizitätsindex.....	75
3.5.7	Statistische Auswertung	76
4	Ergebnisse.....	77
4.1	Subzelluläre Lokalisation von SLC10A5 in unterschiedlichen Zelllinien.....	77
4.2	Kolokalisationen in HEK293-MSR, Huh-7 und HepG2 Zellen.....	78
4.3	Gewebelokalisation von SLC10A5.....	84
4.4	Transportmessungen mit SLC10A5	87
4.4.1	Transportmessung mit einer SLC10A5/NTCP Chimäre	87
4.4.2	Transportmessung in Membranvesikeln	90

4.5	Gallensäurestoffwechsel der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus.....	92
4.5.1	Rückkreuzungsstatus der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäuse	92
4.5.2	Genotypisierung und Zucht der Mauslinien.....	94
4.5.3	Entwicklung der Mausgewichte und Futteraufnahmen.....	96
4.5.4	Untersuchung der Kotproben.....	97
4.5.5	Energiebilanz.....	98
4.5.6	Finale Organentnahme.....	101
4.5.7	Genexpression ausgewählter Gene.....	103
4.6	Massenspektrometrische Gallensäureanalyse	106
4.6.1	Gallensäurekonzentrationen im Portalblut	106
4.6.2	Gallensäurekonzentrationen in der Gallenflüssigkeit	108
4.6.3	Gallensäurekonzentrationen im Kot.....	110
4.6.4	Gallensäurekonzentrationen im Blut des Körperkreislaufs	112
4.7	Hydrophobizitätsindex.....	117
5	Diskussion.....	119
5.1	Die Lokalisation von SLC10A5.....	119
5.1.1	Lokalisation im Gewebe.....	119
5.1.2	Kokalisation im Zellkulturmodell.....	121
5.2	Untersuchung der molekularen Funktion von SLC10A5.....	124
5.2.1	Transportmessungen über die Plasmamembran	124
5.2.2	Transportmessungen in Membranvesikeln	125
5.3	Die <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus.....	126
5.3.1	Vorangegangene Untersuchungen der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mauslinie ...	126
5.3.2	Energie und Stoffwechselbilanz der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus	128
5.3.3	Genetischer Status und nicht-rekombinierte Genbereiche der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus	129
5.3.4	Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme	130
5.3.5	Kalorimetrische Untersuchungen.....	131
5.3.6	Unterschiede in den Gallensäureprofil von <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout- und <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp-Mäusen.....	133
5.3.7	Konjugations- und Hydroxylierungsstatus des Gallensäurepools von <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus	137
5.3.8	Geschlechtsunterschiede der Gallensäureveränderungen der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus	137
5.4	Mögliche Ursachen der Unterschiede im Gallensäurepool von männlichen <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen	138
5.4.1	Gallensäuren und das Mikrobiom	139
5.4.2	<i>De novo</i> Synthese von Gallensäuren.....	141
5.4.3	Transporter des Enterohepatischen Kreislaufs	142

5.4.4	Einfluss auf die Konjugation von Gallensäuren in der Leber	146
5.4.5	Einfluss auf die Rehydroxylierung von Gallensäuren	152
5.4.6	Phylogenetische Betrachtung von SLC10A5	157
5.5	Auswirkungen der erhöhten Konzentrationen sekundärer Gallensäuren	160
5.5.1	Der Hydrophobizitätsindex der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus.....	160
5.5.2	Deoxycholat als Karzinogen	161
5.5.3	Hormonelle Wirkung von Deoxycholat über TGR5.....	163
5.6	Ausblick	164
5.7	Zusammenfassung	166
5.8	Summary	167
6	Literaturverzeichnis	169
7	Anhang	192
8	Danksagung	194

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Molekulare Struktur der Gallensäuren.....	5
Abbildung 1-2: Die wichtigsten Transportsysteme des Enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren	14
Abbildung 3-1: Schema der bei der Codonoptimierung veränderten Bereiche von SLC10A5.	61
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der für die Generierung der Antikörper gewählten Bereiche des SLC10A5-Proteins	63
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des an den <i>Slc10a5</i> -Knockout gekoppelten Bereichs auf Chromosom 3 der Maus.....	68
Abbildung 4-1: Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und GFP-gekoppelten Zellorganellenmarkern in HEK293-MSR Zellen.....	79
Abbildung 4-2: Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und GFP-gekoppelten Zellorganellenmarkern in Huh-7- Zellen	80
Abbildung 4-3: Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und GFP-gekoppelten Zellorganellenmarkern in HepG2-Zellen.....	81
Abbildung 4-4: Statistiken zur Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und organellenspezifischen Markern in HEK293-MSR Zellen	83
Abbildung 4-5: Immunfluoreszenzfärbung von SLC10A5 in Leber- und Nierengewebe von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.	85
Abbildung 4-6: Kolokalisation von SLC10A5 und LAMP-1 im Mausgewebe.....	86
Abbildung 4-7: Fusionsstelle von SLC10A5 und NTCP für die SLC10A5ctNTCP-Chimäre ..	88
Abbildung 4-8: Untersuchung der Transportaktivität einer SLC10A5/NTCP Chimäre über die Plasmamembran.....	89
Abbildung 4-9: Ergebnisse der <i>Slc10a5</i> -Genotypisierung von Mäusen	95
Abbildung 4-10: Schematische Darstellung der Fertilitätsdaten der für den Versuch gezüchteten <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout- und C57B6N Wildtyp-Mäuse.	96
Abbildung 4-11: Gewichtsentwicklung der <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäuse.....	97
Abbildung 4-12: Vergleich der Kotmengen von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.....	98
Abbildung 4-13: Vergleich der Verdaulichen Energien von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.....	99
Abbildung 4-14: Energie- und Futterbilanz von männlichen und weiblichen <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.....	101
Abbildung 4-15: Bauchsitus von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.....	101

Abbildung 4-16: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mausgewebe.....	102
Abbildung 4-17: Genexpression in der Leber von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout Mäusen.....	104
Abbildung 4-18: Relative Genexpression im Lebergewebe der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus	105
Abbildung 4-19: Verhältnisse von Taurin- und unkonjugierten Gallensäuren im peripheren Blut von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.....	114
Abbildung 4-20: Konjugationsstatus des Gallensäurepools in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot	115
Abbildung 4-21: Hydroxylierungsstatus des Gallensäurepools in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot	116
Abbildung 4-22: Vergleich der Hydrophobizitätsindizes von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.	118
Abbildung 5-1: Veränderungen der Gallensäureprofile männlicher <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäuse im Gegensatz zu C57BL6N Wildtyp-Tieren.....	136
Abbildung 5-2: Potentieller Einfluss von SLC10A5 auf die Konjugation rezirkulierender Gallensäuren	148
Abbildung 5-3: Potentieller Einfluss von SLC10A5 auf die Rehydroxylierung von sekundären Gallensäuren	154
Abbildung 5-4: Hypothese zur Interaktion von SLC10A5 mit Cytochrom P450 Oxidasen in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums.....	156
Abbildung 5-5: Vergleich der translatierten SLC10A5-Leserahmen verschiedener Spezies	159

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Hydrophobizitätsindizes (Hlx) der ionisierten Formen verschiedener Gallensäuren nach Heuman (1989)	75
Tabelle 4-1: Transportversuch mit verschiedenen radioaktiv markierten Gallensäuren in Membranvesikeln.....	91
Tabelle 4-2: Nicht-rekombinierter Genbereich der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Maus.....	93
Tabelle 4-3: Gallensäurekonzentrationen im Portalblut von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.....	107
Tabelle 4-4: Gallensäurekonzentrationen in der Gallenflüssigkeit von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen	109
Tabelle 4-5: Gallensäurekonzentrationen in Kotproben von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen.....	111
Tabelle 4-6: Gallensäurekonzentrationen im peripheren Blut von <i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp- und <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mäusen	113
Tabelle 7-1: Hydroxylierungsstatus der Gallensäuren in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot	192

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
ACOT	Acyl-CoA-Thioesterase
AF	Alexa Fluor
Ak	Antikörper
ASBT	Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BAAT	Bile acid coenzym A:amino acid N-acyltransferase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSEP	Bile salt export pump
cDNA	complementary DNA
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
C _T	Signal Threshold Cycle
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DE	verdauliche Energie
DHEAS	Dehydroepiandrosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpm	disintegrations per minute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EHC	Enterohepatischer Kreislauf
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC	Endocytic Recycling Compartment
FATP	Fatty acid transporting peptide
FKS	Fetales Kälberserum
FRT	Flp Recombination Target

FXR	Farnesoid X Receptor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HEK	Human Embryonic Kidney Cell Line
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	Human Hepatoma Cell Line
HI	Hydrophobizitätsindex
hSLC10A5	humaner SLC10A5
HUGO	Human Genome Organisation
Huh7	Hepatocyte-derived carcinoma cell line
IHC	Immunhistochemie
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
ko	Knockout
L	Liter
LXR	Liver X Receptor
m	Meter
M	molar
MGB	Minor Groove Binder
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
mSLC10A5	muriner SLC10A5
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
MVB	Multivesicular Bodies
MW	Mittelwert
n.d.	nicht detektierbar
NTCP	Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OST	Organic solute transporter
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionen

pKS	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PTS	Peroxisomal Targeting Sequence
PXR	Pregnane X Receptor
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro minute (rotations per minute)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHP	Small Heterodimeric Partner
SLC	Solute Carrier
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOAT	Sodium-dependent organic anion transporter
SOC-Medium	Super optimal broth medium with glucose
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
Tet	Tetracyclin
TIGM	Texas A&M Institute for Genomic Medicine
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UHPLC-MS/MS	Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
VDR	Vitamin D Receptor
wt	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis der Gallensäuren

CA	Cholsäure
CDCA	Chenodeoxycholsäure
DCA	Deoxycholsäure
DHCA	Dehydrocholsäure
GCA	Glycocholsäure
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GDCA	Glycodeoxycholsäure
GHCA	Glycohyocholsäure
GHCA	Glycohyodeoxycholsäure
GLCA	Glycolithocholsäure
GUDCA	Glycoursodeoxycholsäure

G- α -MCA	Glyco- α -Muricholsäure
G- β -MCA	Glyco- β -Muricholsäure
G- ω -MCA	Glyco- ω -Muricholsäure
HCA	Hyocholsäure
HDCA	Hyodeoxycholsäure
LCA	Lithocholsäure
MDCA	Murideoxycholsäure
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TDCA	Taurodeoxycholsäure
THCA	Taurohyocholsäure
THDCA	Taurohyodeoxycholsäure
TLCA	Taurolithocholsäure
TMDCA	Tauromurideoxycholsäure
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
T- α -MCA	Tauro- α -Muricholsäure
T- β -MCA	Tauro- β -Muricholsäure
T- ω -MCA	Tauro- ω -Muricholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure
α -MCA	α -Muricholsäure
β -MCA	β -Muricholsäure
ω -MCA	ω -Muricholsäure

1 Einleitung

1.1 Die Solute Carrier Familie 10

Die Superfamilie der *solute carrier* (SLC) besteht zur Zeit aus 65 Genfamilien (SLC1 – SLC56), die sich wiederum aus insgesamt 416 beschriebenen Genen zusammensetzen (www.genenames.org, www.slc.bioparadigms.org). Die SLC Familie 10 wird auch als Familie der natriumabhängigen Gallensäuretransporter bezeichnet. Diese Namensgebung kam aufgrund der Anfang der 1990er Jahre zuerst identifizierten und zugeordneten Gallensäuretransporter NTCP (SLC10A1, *Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide*) (Hagenbuch et al., 1990; Hagenbuch et al., 1991) und ASBT (SLC10A2, *apical sodium-dependent bile acid transporter*) (Wong et al., 1994; Wong et al., 1995) zustande (Geyer et al., 2006). Zurzeit beinhaltet die SLC10 Familie sieben Mitglieder (SLC10A1 – SLC10A7), die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

NTCP ist ein in der basolateralen Membran von Hepatozyten exprimiertes Transportprotein, welches den Transport von Gallensäuren aus dem Portalblut in Hepatozyten entlang eines Na⁺-Gradienten transportiert (Geyer et al., 2006). NTCP ist in der Lage, alle Gallensäuren zu transportieren, zeigt aber unter physiologischen Bedingungen eine wesentlich höhere Affinität zu Taurin- oder Glycin-konjugierten Gallensäuren. Zusätzlich können auch sulfatierte Steroidhormone wie Östron-3-Sulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), wenn auch mit einer sehr geringen Affinität, transportiert werden (Geyer et al., 2006). Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde NTCP zudem als Rezeptor und Eintrittsweg für das humane Hepatitis B Virus (HBV) und Hepatitis D Virus (HDV) identifiziert (Yan et al., 2012). Diese Entdeckung öffnete den Weg für neue Methoden der Erforschung dieser Viren und in Zukunft neuer potentieller Behandlungsmöglichkeiten gegen HBV und HDV.

Kurze Zeit nachdem NTCP als natriumabhängiger Gallensäuretransporter identifiziert wurde, wurde ASBT als das Gegenstück in der apikalen Membran von Enterozyten des Dünndarms entdeckt (Wong et al., 1994; Wong et al., 1995). ASBT transportiert Gallensäuren aus dem Darm entlang eines Natriumgradienten in die Enterozyten. Konjugierte Gallensäuren werden ähnlich wie bei NTCP mit hoher Affinität als Substrat genutzt, wohingegen unkonjugierte Gallensäuren kaum oder gar nicht transportiert werden (Geyer et al., 2006). Eine weitere Lokalisation von ASBT sind die proximalen Tubuli der Niere. Hier absorbiert ASBT Gallensäuren, die glomerulär gefiltert wurden, aus dem Primärharn zurück in die Blutbahn (Christie et al., 1996).

Neben den zwei Gründungsmitgliedern wurden im Jahr 2004 die drei *orphan carrier* SLC10A3 (P3), SLC10A4 (P4) und SLC10A5 (P5) auf Grund ihrer Sequenzhomologie zu NTCP und ASBT der SLC Familie 10 zugeordnet (Hagenbuch und Dawson, 2004). SLC10A3 wurde

erstmalig bereits Ende der Achtziger Jahre noch vor NTCP und ASBT beschrieben. Seine Funktion ist bislang allerdings nicht aufgeklärt. Basierend auf einer breiten Gewebeexpression und der Lokalisierung der Sequenz in einer CpG-Insel der DNA wird SLC10A3 eine mögliche Funktion als Haushaltsgen zugeschrieben (Alcalay und Toniolo, 1988).

SLC10A4 wiederum ist am stärksten im Gehirn und der Plazenta exprimiert und zeigt, anders als die beiden Gründungsmitglieder der Familie, ein intrazelluläres vesikuläres Expressionsmuster. Im zentralen Nervensystem lassen sich in der Immunfluoreszenz Überlagerungen von SLC10A4 mit den synaptischen vesikulären Proteinen VACHT und VMAT2 darstellen. Die *Slc10a4*^{-/-} Knockout Maus reagiert hypersensitiv auf unterschiedliche Psychostimulantien wie Amphetamine oder endogenen cholinergen Stimuli (Larhammar et al., 2015). Diese Befunde deuten alle darauf hin, dass SLC10A4 an der vesikulären Speicherung oder Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt sein könnte. Eine Transportfunktion für verschiedene Neurotransmitter konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden (Geyer et al., 2008; Burger et al., 2011; Schmidt et al., 2015).

SOAT (Gensymbol: *SLC10A6*, *sodium-dependent organic anion transporter*) ist der dritte funktionell charakterisierte Transporter der SLC10 Familie. Im Gegensatz zu NTCP und ASBT transportiert SOAT jedoch keine Taurin- oder Glycin-konjugierten Gallensäuren, sondern sulfatierte Steroidhormone und sulfo-konjugierte Gallensäuren (Geyer et al., 2004; Geyer et al., 2007). Am stärksten exprimiert wird der humane SOAT im Hoden und der Plazenta (Geyer et al., 2007), der murine Soat in der Lunge, der Haut und den Hoden (Grosser et al., 2013).

Das jüngste der SLC10 Familie zugeordnete Mitglied ist der *orphan carrier* SLC10A7 (Godoy et al., 2007). SLC10A7 ist in verschiedensten Geweben exprimiert und für das Homolog RCh1 in *Candida albicans* ist ein Einfluss des Proteins auf die Calciumhomöostase beschrieben (Godoy et al., 2007; Jiang et al., 2012). In Säugetieren bestätigte sich diese Theorie mit Hilfe der *Slc10a7*^{-/-} Knockout-Maus. Diese Mauslinie ist gekennzeichnet durch Skelett-Anomalien der langen Röhrenknochen, Wachstumsfugen und des Enamels. Diese Befunde entsprechen humanen Patienten mit skelettaler Dysplasie und Amelogenesis Imperfecta, bei denen homozygote Mutationen des *SLC10A7* Gens identifiziert wurden (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018).

1.2 SLC10A5

Im Fokus dieser Dissertation steht der *orphan carrier* SLC10A5, welcher gemeinsam mit SLC10A3 und SLC10A4 der Familie der natriumabhängigen Gallensäuretransporter zugeordnet wurde (Hagenbuch und Dawson, 2004). Diese Zuordnung geschah auf Grund der Sequenzhomologie zu den bereits beschriebenen Mitgliedern dieser Gen-Familie. Die größte Sequenzhomologie innerhalb der SLC10 Familie besteht zwischen SLC10A5 und SLC10A3 mit 33,9%. Zu NTCP und ASBT beträgt die Homologie jeweils 22% (Fernandes et al., 2007). Das *SLC10A5* Gen des Menschen kodiert für ein 438 Aminosäuren langes Protein, die analogen Proteine von Ratte und der Maus zählen 434 Aminosäuren. Eine Besonderheit gegenüber den anderen Mitgliedern der SLC10 Familie ist, dass SLC10A5 nur auf einem Exon codiert wird (Fernandes et al., 2007).

Exprimiert wird SLC10A5 im Menschen am stärksten in der Leber und der Niere, in Maus und Ratte zusätzlich im Dünndarm. Dieses Expressionsprofil überschneidet sich mit der Expression von NTCP in der Leber und mit der Expression von ASBT in Dünndarm und Nieren, weshalb für SLC10A5 ebenfalls eine Rolle in der Gallensäurehomöostase postuliert wurde (Fernandes et al., 2007; Aretz, 2015). In der Niere wurde die mRNA von SLC10A5 durch *in-situ*-Hybridisierung angefärbt und eine Expression in proximalen Tubuli gezeigt (Fernandes et al. 2007).

Erste Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von SLC10A5 mit einem GFP-markierten Konstrukt zeigen das Protein in intrazellulären Strukturen und nicht in der Plasmamembran, wie es für andere Mitglieder der SLC10 Familie zu beobachten ist (Pellicoro, 2008). In der Dissertation von Dr. Julia Aretz (Aretz 2015) wurde dieses intrazelluläre Expressionsmuster im Zellkulturmodell auf das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat eingegrenzt, konnte durch unspezifisch bindende Antikörper im Gewebe von Mäusen jedoch nicht bestätigt werden. Untersuchungen in U2OS-Zellen zeigten ebenfalls eine intrazelluläre Verteilung des Proteins, die rein optisch auf eine Lokalisation im Golgi-Apparat hinwies (Bijmans et al., 2012).

Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung am Gallensäurestoffwechsel ist die Überschneidung der Expressionsprofile von SLC10A5 und dem Farnesoid X Rezeptor (FXR), einem Kernrezeptor der maßgeblich die Gallensäurehomöostase steuert (Geyer et al., 2006; Zollner et al., 2006; Fernandes et al., 2007; Pellicoro, 2008). *In vitro* lässt sich die *SLC10A5*-Expression durch Chenodeoxycholat über FXR herunterregulieren, was sich *in vivo* durch Experimente an Gallengangs-ligierten Ratten bestätigen ließ (Pellicoro 2008).

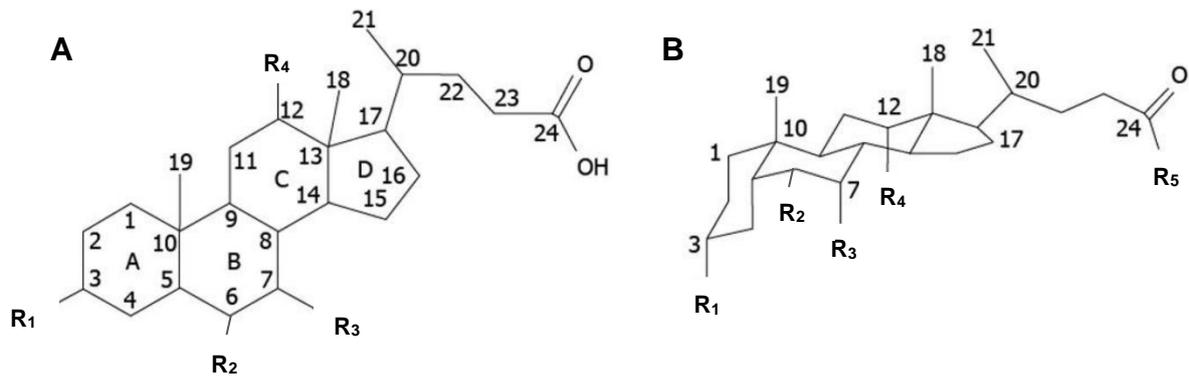
Die molekulare Funktion von SLC10A5 konnte bislang, genau wie eine präzise subzelluläre Lokalisation, nicht beschrieben werden. Weder der humane SLC10A5, noch der murine SLC10A5 zeigt in *Xenopus laevis* Oozyten eine Transportaktivität für Cholat, Taurocholat oder

die Steroidsulfate Estron-3-Sulfat und DHEAS (Fernandes et al., 2007). Transportversuche in nativen und digitonin-permeabilisierten HEK293- und HepG2-Zellen mit einem breiten Spektrum an konjugierten- und unkonjugierten Gallensäuren als Substrat konnten ebenfalls keinerlei Transportaktivität zeigen (Aretz 2015).

Um eine Betrachtung des komplexen Zusammenspiels einer Expression von SLC10A5 in verschiedenen Anteilen des Enterohepatischen Kreislaufs abzubilden wurde die *Slc10a5*^{-/-} Knockout Maus generiert. Diese Mauslinie bildet durch den Austausch des *Slc10a5*-Gens durch eine Selektionskassette kein SLC10A5 Protein. In einem Pilotversuch zeigte sich bei einer Überladung des Enterohepatischen Kreislaufs durch die Fütterung von 0,5% Cholsäure ein massives Gallensäurekonjugationsdefizit der *Slc10a5*^{-/-} Knockout Mäuse im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Durch diese Ergebnisse konnte erstmals *in vivo* die Relevanz von SLC10A5 auf den Gallensäurestoffwechsel gezeigt werden (Aretz 2015).

1.3 Gallensäuren

Unter dem Begriff der Gallensäuren ist eine Gruppe von Stoffen zusammengefasst, die ähnliche, aber nicht gleiche chemische Strukturen und Eigenschaften besitzen (Monte et al., 2009). Ausgangsstoff für alle Gallensäuren ist das Cholesterin. Gallensäuren höherer Vertebraten bestehen aus einem Steroidgerüst mit 24 Kohlenstoffatomen, sind etwa 20Å groß mit einem durchschnittlichen Radius von 3,5Å und erhalten ihre unterschiedlichen Eigenschaften durch alternierende Hydroxylierungsmuster sowie die Konjugation an Taurin oder Glycin (Monte et al., 2009). Das Steroid-Grundgerüst besteht aus drei Ringen mit je 6 Kohlenstoffatomen und einem Ring mit 5 Kohlenstoffatomen. Die Hydroxylierungen erfolgen an den Kohlenstoffatomen C3 (R1); C6 (R2); C7 (R3) und C12 (R4) in Gallensäurespezifischen Kombinationen und ausgerichtet in α - oder β -Position (Abbildung 1-1). Durch den Gegensatz zur gegenüberliegenden, durch Methylreste an C18 und C19 hydrophoben β -Seite erhalten Gallensäuren ihre amphiphilen Eigenschaften (Hofmann, 1999; Hofmann und Hagey, 2008; Monte et al., 2008; Monte et al., 2009). Das Verhältnis von Hydrophobizität und Hydrophilie variiert stark zwischen den verschiedenen Gallensäuren und definiert die jeweiligen physiologischen und pathologischen Charakteristika (Hofmann und Hagey, 2008; Monte et al., 2008; Monte et al., 2009).



C	Gallensäure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
	Cholat	α-OH	H	α-OH	α-OH	OH	
	Chenodeoxycholot	α-OH	H	α-OH	H	OH	
	Deoxycholot	α-OH	H	H	α-OH	OH	
	Lithocholat	α-OH	H	H	H	OH	
	Ursodeoxycholot	α-OH	H	β-OH	H	OH	
	Hyocholat	α-OH	α-OH	α-OH	H	OH	
	Hyodeoxycholot	α-OH	α-OH	H	H	OH	
	α-Muricholat	α-OH	β-OH	α-OH	H	OH	
	β-Muricholat	α-OH	β-OH	β-OH	H	OH	
	ω-Muricholat	α-OH	α-OH	β-OH	H	OH	
	Murideoxycholot	α-OH	β-OH	H	H	OH	
	Glycin-Konjugate						NHCH ₂ COO ⁻
	Taurin-Konjugate						NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻

Abbildung 1-1: Molekulare Struktur der Gallensäuren

Die im Säugetier vorkommenden Gallensäuren basieren alle auf dem gleichen Steroidgerüst und unterscheiden sich durch Hydroxylierungen an unterschiedlichen Positionen der Molekülstruktur (R₁ - R₄). Die Konjugation von Gallensäuren mit Glycin oder Taurin erfolgt an R₅.

A - Schematische Darstellung des Grundgerüsts von C24-Gallensäuren

B - Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von C24-Gallensäuren

C - Auflistung der Hydroxylierungsmuster verschiedener Gallensäuren

(nach Monte et al., 2009)

1.4 Gallensäuresynthese

Die Synthese von Gallensäuren ist in Säugetieren der Hauptweg für den Metabolismus von mit der Nahrung aufgenommenem Cholesterin. Durch das Zusammenspiel von 17 verschiedenen Enzymen wird das unlösliche und hochgradig hydrophobe Molekül Cholesterin in amphipathische Detergenzien umgewandelt, die Gallensäuren (Russell, 2003). Es können zwei unterschiedliche Synthesewege für Gallensäuren voneinander getrennt werden: der klassische (neutrale) Syntheseweg und der alternative (saure) Syntheseweg.

Der klassische (neutrale) Syntheseweg ist ausschließlich in Hepatozyten vorzufinden und beginnt mit der 7 α -Hydroxylierung von Cholesterin durch CYP7A1 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Mikrosomen). Diese 7 α -Hydroxylase ist gleichzeitig das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gallensäuresynthese. Durch eine weitere Modifikation am Steroidgrundgerüst durch das Enzym Hydroxy-Delta-5-Steroid-Dehydrogenase (HSD3B7) entsteht 7 α -Hydroxy-4-cholesten-3-on, der gemeinsame Vorläufer von Cholat und Chenodeoxycholol. An dieser Stelle bestimmt die Expression der mikrosomalen 12 α -Hydroxylase (CYP8B1) in welchem Verhältnis Cholat und Chenodeoxycholol entstehen. CYP8B1 initiiert dabei die Synthese von 7 α ,12 α -Dihydroxy-4-Cholesten-3-on welches durch die beiden zytosolischen Enzyme AKR1D1 und AKR1C4 (Aldo-Keto Reduktase Familie 1 Mitglieder D1 bzw. C4) anschließend zu 5 β -Cholestan-3 α ,7 α ,12 α -triol, dem Vorläufer von Cholat, umgewandelt wird. Findet keine 12 α -Hydroxylierung durch CYP8B1 statt, wird 7 α -Hydroxy-4-cholesten-3-on direkt durch AKR1D1 und AKR1C4 im Zytosol in 5 β -Cholestan-3 α ,7 α -triol, dem Vorläufer von Chenodeoxycholol, umgewandelt. Die Seitenkette beider Gallensäurevorläufer wird anschließend durch die mitochondriale 27-Steroid-Hydroxylase (CYP27A1) oxidiert, wodurch erst eine Aldehyd-Gruppe und anschließend die finale Carboxyl-Gruppe entsteht. Die Produkte sind 3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Koprostansäure, welche zu Cholat wird und 3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -Koprostansäure, die zu Chenodeoxycholol wird (Axelson et al., 2000; Russell, 2003; Chiang, 2004, 2009).

Der alternative (saure) Syntheseweg für Gallensäuren zeichnet sich dadurch aus, dass auf dem Weg zu den primären Gallensäuren Cholat und Chenodeoxycholol saure Intermediate gebildet werden. Dieser alternative Syntheseweg beschränkt sich dabei nicht auf das Lebergewebe, sondern findet hauptsächlich im peripheren Gewebe statt (Chiang, 2004). Der initiale Schritt des alternativen Synthesewegs ist die Oxidation der Seitenkette des Cholesterins durch die 27-Steroid-Hydroxylase (CYP27A1) zu 27-Hydroxycholesterin und 3 β -Hydroxy-5-koprostansäure. Aus diesen Intermediaten entstehen durch die 7 α -Hydroxylase (CYP7B1) 7 α ,27-Dihydroxycholesterin und 3 β ,7 α -Dihydroxy-5-koprostansäure. Über die Blutbahn gelangen diese oxidierten Sterole in die Leber und werden dort in den klassischen Syntheseweg integriert und zu Gallensäuren umgebaut. Neben den 27-Oxysterolen werden

vor allem im Gehirn und dem Rückenmark aus Cholesterin 24-Oxysterole durch die 24-Hydroxylase (CYP46A1) gebildet und in der Leber in primäre Gallensäuren umgewandelt (Schwarz et al., 2001; Russell, 2003; Chiang, 2017b; Pandak und Kakiyama, 2019). Dieser Mechanismus stellt eine wichtige Elimination von Cholesterin aus dem zentralen Nervensystem dar, trägt aber nur wenig zur gesamten Synthese von Gallensäuren bei (Björkhem et al., 1999). Der alternative Gallensäuresyntheseweg trägt beim Menschen nur pränatal und im Kindesalter signifikant zur *de-novo*-Synthese der Gallensäuren bei. Beim adulten Menschen sinkt dieser Anteil auf etwa 10% des gesamten Gallensäurepools (Sarenac und Mikov, 2017).

Im Gegensatz dazu zeigt die Gallensäuresynthese bei Mäusen einige Unterschiede auf. Der klassische und der alternative Syntheseweg tragen anders als beim Menschen etwa gleich stark zur Bildung des gesamten Gallensäurepools bei (Chiang, 2017a). Eine weitere Besonderheit sind bei Mäusen und Ratten die Muricholsäuren. Durch 6 α -Hydroxylierung entsteht aus Chenodeoxycholat α -Muricholat, welches durch Epimerisierung der hinzugewonnenen α -Hydroxy-Gruppe zu β -Muricholat wird. Dadurch wird bei den Mäusen ein stark hydrophiler Gallensäurepool erzeugt, der sich signifikant von dem des Menschen unterscheidet. Muricholsäuren sind beim Menschen nur in sehr geringen Mengen zu messen (Heuman, 1989; Takahashi et al., 2016; Chiang, 2017a).

1.5 Konjugation von Gallensäuren

Primäre Gallensäuren, die in der Leber synthetisiert werden und sekundäre Gallensäuren, die im Darm durch bakterielle Umbauprozesse entstehen, machen unter physiologischen Umständen nur einen geringen Teil des gesamten Gallensäurepools aus. Über 98% der Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit liegen unter physiologischen Umständen als Konjugate mit Glycin oder Taurin und der entsprechenden Gallensäure vor. Der Begriff „Konjugat“ entwickelte sich im Laufe des zwanzigsten Jahrhunderts zu einem Synonym für die N-Acylamidierung von Gallensäuren und Aminosäuren. Nachdem gezeigt wurde, dass einige Gallensäurespezies nicht nur an Aminosäuren gebunden werden können, sondern auch sulfatiert oder glucoronidiert vorliegen können, wurde eine Abgrenzung der Begrifflichkeiten notwendig. In der hier vorliegenden Arbeit werden ausschließlich N-Acyl-Amidierungen an Glycin und Taurin als Konjugate bezeichnet (Hofmann, 1989; Hofmann und Hagey, 2008; Styles et al., 2016). Der evolutionäre Nutzen der effektiven Konjugation von Gallensäuren liegt in der Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Moleküle. Bei einem intestinalen pH-Wert von 6-7 liegen konjugierte Gallensäuren durch eine Verringerung ihres pKs Wertes größtenteils ionisiert vor und sind komplett wasserlöslich. Zusätzlich führt die

Konjugation zu einer negativen Ladung von Gallensäuren, was die Membranpermeabilität und passive Perfusionsmöglichkeit gegen Null senkt. Diese Eigenschaften senken die Toxizität der Gallensäuren und machen sie für den Organismus kontrollierbar (Hofmann und Hagey, 2008; Monte et al., 2009).

Für die Konjugation von Gallensäuren an die Aminosäuren Taurin oder Glycin werden zwei unterschiedliche Schritte benötigt. Im ersten Schritt werden alle Gallensäuren enzymatisch an Coenzym-A gebunden und somit aktiviert, im zweiten Schritt folgt die Konjugation der Gallensäuren an die entsprechende Aminosäure (Monte et al., 2009). Im Folgenden werden einige der für diese Schritte benötigten Enzyme näher vorgestellt:

Fatty acid transport protein 2 (FATP2, SLC27A2, früher very long-chain acyl-CoA synthetase (VLACS))

Das Protein FATP2 wird durch das Gen *SLC27A2* kodiert und vornehmlich in Leber und Nieren exprimiert. Auf subzellulärer Ebene beschränkt sich die Expression auf die Plasmamembran, Peroxisomen und das ER. Ursprünglich wurde FATP2 als *very long-chain acyl-CoA synthetase (VLACS)* als Fettsäuren-aktivierendes Enzym identifiziert, besitzt jedoch zusätzlich die Funktion eines Aufnahmetransporters für langkettige Fettsäuren. Im Menschen kommen zwei unterschiedliche Splice-Varianten von *SLC27A2* vor: FATP2a und FATP2b. Beide Varianten sind in der Lage Fettsäuren zu transportieren, aber nur FATP2a zeigt eine Thioesterase-Aktivität (Mihalik et al., 2002; Melton et al., 2011; Anderson und Stahl, 2013).

Zusätzlich zur Funktion im Fettstoffwechsel von Leber- und Nierenzellen zeigt sich die Synthetase-Aktivität von FATP2 auch in der Aktivierung von Gallensäure-Vorläufern. Im ER werden Dihydroxykoprostanol und Trihydroxykoprostanol als Vorläufer von Cholat bzw. Chenodeoxycholol an Coenzym-A gebunden, bevor die Synthese und Konjugation durch weitere Enzyme in den Peroxisomen beendet werden kann. Die Aktivierung von Cholat und Chenodeoxycholol nach der Rezirkulierung aus dem Darm erfolgt jedoch nicht durch FATP2, was die Synthetase-Aktivität auf die *de-novo* Synthese von Gallensäuren beschränkt (Mihalik et al., 2002; Monte et al., 2009; Anderson und Stahl, 2013).

Fatty acid transport protein 5 (FATP5, SLC27A5, früher bile acid CoA synthetase (BACS))

Das zweite Enzym der *SLC27* Familie, das an der Konjugation von Gallensäuren beteiligt ist, ist FATP5 oder ehemals *bile acid CoA synthetase (BACS)*. Genau wie FATP2 hat auch FATP5 eine duale Funktionsweise als Transporter für langkettige Fettsäuren und als Synthetase für die Bindung von Coenzym-A an Fettsäuren bzw. Gallensäuren. FATP5 wird exklusiv in Hepatozyten exprimiert, wobei sich die subzelluläre Lokalisation auf die basolaterale Membran

und Mikrosomen beschränkt. Die FATP5-Knockout Maus ist in der Lage Dihydroxykoprostansäure und Trihydroxykoprostansäure zu aktivieren und zu konjugieren, nicht jedoch rezirkulierende Gallensäuren. Das spricht zum einen dafür, dass FATP2 tatsächlich eine spezifische Rolle bei der Aktivierung von Gallensäuren Vorläufern einnimmt und zum anderen, dass FATP5 durch seine Lokalisation hauptsächlich an der Re-konjugation von re-zirkulierenden Gallensäuren beteiligt ist. (Mihalik et al., 2002; Doege et al., 2006; Hubbard et al., 2006; Anderson und Stahl, 2013).

Bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase (BAAT)

Die eigentliche Konjugation mit Taurin und Glycin übernimmt die *bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase* oder kurz BAAT. Dieses Enzym katalysiert einen zweistufigen Prozess, bei dem aus den mit Coenzym-A aktivierten Gallensäuren an Taurin oder Glycin gekoppelte Gallensäuren bzw. deren Salze werden. Dabei wird zuerst die Thioester Bindung der Gallensäure mit Coenzym-A hydrolysiert und eine Verbindung zwischen Gallensäure und einem Cystein von BAAT hergestellt. Im zweiten Schritt führt die N-Acyltransferase Aktivität von BAAT dazu, dass sich aus der Gallensäure und Taurin oder Glycin die entsprechende konjugierte Gallensäure bildet. Dieser Mechanismus ist innerhalb der bislang untersuchten Säugetiere hoch konserviert und unterscheidet sich nur im Verhältnis der Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensäuren (He et al., 2003; Styles et al., 2016). Außerhalb der Klasse der Säugetiere werden Gallensäuren ausschließlich an Taurin konjugiert. Innerhalb dieser Klasse variieren die Konjugationsverhältnisse, Affinitäten und Effizienzen der entsprechenden BAAT Isoenzyme stark. Beim Menschen werden sowohl Taurin als auch Glycin im Verhältnis 1:3 durch hBAAT konjugiert. Die Konjugation von Gallensäuren bei der Maus erfolgt fast komplett an Taurin (Kwakyee et al., 1991; Chiang, 2017a).

Diese Prozesse finden entsprechend der Lokalisation von BAAT in den Peroxisomen und dem Zytosol statt. Ursprünglich ging man davon aus, dass es zwei unterschiedliche Enzyme sein müssen, welche die Gallensäurekonjugation entsprechend der Aufteilung zwischen neu synthetisierten Gallensäuren und rezirkulierten Gallensäuren katalysieren. Diese Auffassung war kongruent mit der Aufteilung der Aktivierung dieser Gallensäuren durch FATP2 und FATP5 (Solaas et al., 2000; O'Byrne et al., 2003). Inzwischen ist jedoch klar, dass beide Funktionen von BAAT abgedeckt werden können. Ursache dafür ist das unvollständige peroxisomale Sortierungsmotiv „-SQL“ am C-Terminus von BAAT. Das eigentliche, sehr effektive *peroxisomal targeting signal* (PTS) ist „-SKL“. Durch das schwächere Sortierungsmotiv von BAAT liegen nur etwa 25% des Proteins in den Peroxisomen vor, der Rest verteilt sich auf das Zytosol. Dadurch ist es möglich, dass die Konjugation von neu-

synthetisierten und rezirkulierten Gallensäuren vom gleichen Enzym katalysiert werden kann (Styles et al., 2016).

1.6 Gallensäuren und das Mikrobiom

Das Mikrobiom ist die Gesamtheit der Bakterien, die in mutualistischer Symbiose, oder zum Teil auch in kommensalischer Symbiose, den Darm besiedeln. Beim Menschen liegt die Konzentration der Bakterien bei etwa $2 - 5 \times 10^{11}$ Bakterien pro Gramm Kot zusätzlich zu einigen hundert Gramm Bakterien, welche die Darmwand besiedeln. Die meisten dieser Bakterien sind obligat anaerob und setzen täglich mehrere hundert Gramm abgestoßene Enterozyten, Pflanzenbestandteile wie Polysaccharide und Cellulose sowie Gallensäuren in kurzkettige Fettsäuren um. Etwa 10% der täglichen Kalorienaufnahme wird durch diese Prozesse generiert und zeigt deutlich die Relevanz der bakteriellen Besiedlung des Darms (Human microbiome project, 2012; Ridlon et al., 2014). Über 90% der Darmbakterien gehören zu den Stämmen *Firmicuta* und *Bacteroidetes*, der Rest setzt sich aus den Stämmen *Proteobacteria*, *Acinetobacteria*, *Fusobacteria* und *Verrucomicrobia* zusammen (Human microbiome project 2012). Diese Zusammensetzung kann durch das Lebensalter, die Diät, Xenobiotika und Erkrankungen verändert werden. Den größten Anteil an der Regulation des Mikrobioms machen jedoch die Zusammensetzung der Galle und die Größe des Gallensäurepools aus (Ridlon et al., 2014).

Die Gallensäuren beeinflussen die Bakterien entweder direkt durch ihre antimikrobiellen und hydrophoben Eigenschaften (Begley et al., 2005) oder indirekt über eine Ausschüttung antimikrobieller Peptide über den Kernrezeptor FXR (Inagaki et al., 2006). Ein Überangebot an Gallensäuren führt dabei dazu, dass sowohl die Vielfalt der Bakterien im Darm signifikant abnimmt als auch das Verhältnis der oben genannten Bakterienstämme untereinander verschoben wird. Die Folge dieser Imbalance ist ein breites Spektrum an Erkrankungen des Darms und des gesamten Organismus, unter anderem Entzündungen (Swidsinski et al., 2002), Autoimmunerkrankungen (Vaahtovuori et al., 2008), psychische Erkrankungen (Cryan und Dinan, 2012), die Bildung von Tumoren (Moore und Moore, 1995; Ajouz et al., 2014; Ridlon et al., 2014) und Entwicklungsstörungen (Ward et al., 2012; Kang et al., 2013). Zu den Bakterien, die von einem vermehrten Angebot an Gallensäuren profitieren, zählen vor allem Arten, die in der Lage sind eine 7α -Hydroxylierung durchzuführen, wie z.B. *Clostridium spp.* und *Eubacterium spp.* Unter physiologischen Umständen stellen diese Bakterien nur 0,025% des gesamten Mikrobioms dar (Islam et al., 2011; Ridlon et al., 2014; Winston und Theriot, 2016).

Verstärkt wird diese gegenseitige Abhängigkeit von Gallensäuren und dem Mikrobiom dadurch, dass die Einflussnahme in beide Richtungen stattfindet. Eine Dysbiose, die in den

meisten Fällen durch Antibiotika, Glucocorticosteroide oder eine fehlerhafte Ernährung entsteht, kann zu einer sekundären Verschiebung des Gallensäurepools führen. Beim Vergleich der Größe des Gallensäurepools von normal gehaltenen Mäusen und keimfrei gehaltenen Mäusen zeigt sich eine signifikante Erhöhung des Gallensäurepools bei den keimfrei gehaltenen Mäusen (Sayin et al., 2013; Just et al., 2018; Parker et al., 2018).

1.7 Regulation von Gallensäuren

Unter physiologischen Umständen bleibt der Gallensäurehaushalt des Körpers, durch ein präzises Zusammenspiel aus *de-novo* Synthese von Gallensäuren in der Leber und deren Ausscheidung über Darm und Nieren, konstant. Dieser präzise Ausgleich wird durch eine Reihe von Kernrezeptoren im ganzen Organismus gewährleistet. Ermöglicht wird dies durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der bei einem zu großen Angebot an Gallensäuren die Expression der Enzyme CYP7A1 und CYP8B1 verringert und somit die *de-novo* Gallensäuresynthese hemmt. Dazu binden Gallensäuren an den *farnesoid X receptor* FXR, wodurch der *short heterodimeric partners* SHP transkribiert wird. SHP bindet und hemmt das *liver receptor homologue-1* LRH-1, welches der aktivierende Faktor für die Expression von CYP7A1 und CYP8B1 darstellt (Russell, 2003; Hoeke et al., 2014). Gleichzeitig wird über FXR die Expression von Gallensäure-Import Proteinen wie z.B. NTCP in der Leber verringert und die Expression von Exportern wie z.B. BSEP gesteigert. Dazu bildet FXR mit dem *retinoid X receptor* RXR ein heterodimer, welches dann an das *FXR response element (FXRE)* stromaufwärts des *ABCB11*-Gens (BSEP-Protein) bindet und so die Expression steigert (Kassam et al., 2003; Song et al., 2008; Hoeke et al., 2014). Zusammengefasst bietet FXR der Leber einen Schutzmechanismus vor zu hohen, toxischen Gallensäurekonzentrationen über eine Verringerung der *de-novo*-Synthese und ein Senken der intrazellulären Gallensäurekonzentrationen. Gallensäuren beeinflussen die Aktivierung von FXR auf Grund ihrer verschiedenen physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich stark. Der potenteste Aktivator von FXR ist Chenodeoxycholat mit einem EC_{50} von unter 10 μ M. Darauf folgen Lithocholat und Deoxycholat, welche FXR etwa gleich stark aktivieren. Cholat ist ebenfalls ein Aktivator, wenn auch etwas schwächer. Die genannten Gallensäuren aktivieren FXR unabhängig davon ob sie konjugiert sind oder unkonjugiert vorliegen (Li et al., 2013).

Neben FXR gibt es noch eine Reihe weiterer Kernrezeptoren, die die Gallensäurehomöostase beeinflussen und steuern. Der *liver X receptor α* (LXR α) bindet Oxysterole und induziert über ein *response element* die Expression von CYP7A1 bei Ratte und Maus. Durch LXR α wird somit eine Verbindung zwischen Cholesterinstoffwechsel und Gallensäurestoffwechsel hergestellt. Im Umkehrschluss sind Menschen, anders als murine Spezies nicht in der Lage auf eine

Erhöhung des Cholesterinspiegels mit einer erhöhten Aktivität von CYP7A1 und einem Umbau in Gallensäuren zu reagieren (Xu et al., 1995; Russell, 2003). Einer Ansammlung von toxischen Oxysterolen wirkt der Kernrezeptor HNF-4 α entgegen. Durch die Aktivierung dieses Kernrezeptors wird die Expression der Oxysterol-7 α -Hydroxylase (CYP7B1) gesteigert. Gleichzeitig kommt es zur Verringerung der Expression von CYP7A1 (Hayhurst et al., 2001). Weitere protektive Mechanismen werden durch die Kernrezeptoren *pregnane X receptor* (PXR), *constitutive androstane receptor* (CAR) und den *vitamin D receptor* (VDR) vermittelt. Akkumulieren bestimmte Gallensäuren wie z.B. Lithocholat im Organismus werden über diese Kernrezeptoren Enzyme wie Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen oder Sulfotransferasen vermehrt exprimiert und Gallensäuren so detoxifiziert und renal ausgeschieden. Zusätzlich wird PXR und CAR eine Beeinflussung einiger Synthesenzyme für Gallensäuren zugeschrieben, die bislang jedoch nicht gänzlich aufgeklärt ist (Russell, 2003; Wagner et al., 2005; Beilke et al., 2009). Die protektiven Funktionen von PXR und CAR weiten sich zudem auf das Mikrobiom aus. Eine pharmakologische Aktivierung dieser Kernrezeptoren führt zu einer Veränderung Gallensäuren modifizierender Bakterienspezies im Darm und somit zu Verschiebungen im Gallensäureprofil der untersuchten Mäuse. Ob dieser Effekt jedoch primär ist oder ein sekundärer Einfluss durch Verschiebungen der den Bakterien zur Verfügung stehenden Gallensäuren, scheint nicht gänzlich geklärt zu sein (Dempsey et al., 2019).

Neben den Kernrezeptoren für Gallensäuren wurde 2003 der erste G-Protein abhängige Gallensäurerezeptor *Takeda G-Protein Coupled Receptor 5* (TGR5) identifiziert, der auf der Oberfläche eines breiten Spektrums unterschiedlicher Zellen exprimiert wird (Maruyama et al., 2002; Kawamata et al., 2003). Dazu gehören unter anderem der Magen-Darm-Trakt, im speziellen die submuköse Innervation des Darms, wodurch Gallensäuren einen Einfluss auf die Peristaltik nehmen können. Der Glukosestoffwechsel wird durch die über TGR5 ausgelöste Ausschüttung des Hormons GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) beeinflusst und führt zusammen mit der Expression von TGR5 im braunen Fettgewebe und der Skelettmuskulatur zu einer Modulation des Energie- und Sauerstoffverbrauchs im gesamten Organismus (Bunnnett, 2014; Duboc et al., 2014). Die Expression von TGR5 in Cholangiozyten und dem Epithel der Gallenblase ermöglicht eine Gallensäureabhängige Kontrolle des Füllungszustandes der Gallenblase und deren Entleerung in den Zwölffingerdarm (Bajor et al., 2015; Camilleri et al., 2015). Zusätzlich ist eine Expression von TGR5 in Makrophagen und Monozyten beschrieben, welche auf eine immunmodulatorische, anti-inflammatorische Wirkung von Gallensäuren durch eine Aktivierung von TGR5 hindeutet (Kawamata et al., 2003; Cipriani et al., 2013) *In vitro* wurde eine effektive Aktivierung durch die Gallensäuren LCA > DCA > CDCA > CA in HEK293 Zellen (Maruyama et al., 2002) bzw. TLCA > LCA > DCA > CDCA > CA in CHO Zellen (Kawamata et al., 2003) festgestellt. Es gibt noch eine Vielzahl weiterer Effekte die Gallensäuren über TGR5 im gesamten Organismus ausüben können. Dadurch zeigt sich, dass

Gallensäuren neben ihrer Solubilisierung von Fetten im Darm weitaus mehr Funktionen haben und weite Teile des Organismus betreffen.

1.8 Der enterohepatische Kreislauf

Der Begriff „Enterohepatischer Kreislauf“ (EHC) kennzeichnet die Zirkulation von Gallensäuren zwischen der Leber und dem Dünndarm. Im gesunden Organismus werden mehr als 95% der in den Dünndarm abgegebenen Gallensäuren im Ileum absorbiert. Die restlichen 5%, die in das Colon gelangen, werden von Bakterien de-konjugiert und oxidiert und nur ein Bruchteil dieser Gallensäuren wird über den Kot ausgeschieden. Die Menge an Gallensäuren, die über die Nieren ausgeschieden wird ist noch geringer (Lee et al., 2001; Hofmann, 2009).

In den Hepatozyten neu synthetisierte Gallensäuren werden gemeinsam mit den rezirkulierten Gallensäuren über die ATP-abhängige *bile salt export pump* BSEP (*ABCB11*-Gen) (Gerloff et al., 1998; Stieger et al., 2007) in die Gallenkanälchen abgegeben und bei den meisten Säugetieren in der Gallenblase gespeichert. Die Gallenflüssigkeit wird dann, meistens assoziiert mit einer Aufnahme von Nahrung, in den Dünndarm entleert und ermöglicht die Absorption und Verdauung von Lipiden (Baxter et al., 1985). Die Reabsorption konjugierter Gallensäuren erfolgt aktiv durch ASBT im Ileum (Wong et al., 1994; Wong et al., 1996). Unkonjugierte Gallensäuren, welche durch bakterielle Prozesse im Dickdarm entstehen, gelangen passiv in die Enterozyten (Mekhjian et al., 1979). Der Transport der Gallensäuren von der apikalen zur basolateralen Membran der Enterozyten, ähnlich wie der intrazelluläre Transport der Gallensäuren in den Hepatozyten, ist bislang nicht gänzlich aufgeklärt (Coppola et al., 1998; Agellon und Torchia, 2000). Ein möglicher Kandidat für den intrazellulären Transport von Gallensäuren im Ileum ist das zytosolisch lokalisierte Bindungsprotein I-BABP (Coppola et al., 1998; Grober et al., 1999). Der Export der Gallensäuren aus den Enterozyten in das Portalblut geschieht größtenteils durch das Heterodimer *organic solute transporter* OST α /OST β (Dawson et al., 2004). Über die Pfortader gelangen die Gallensäuren, gebunden an Albumin und in kleineren Mengen auch an Lipoproteine zur Leber (Rudman und Kendall, 1957; Ceryak et al., 1993). Über NTCP werden, unter Ko-Transport mit Natrium, hauptsächlich konjugierte Gallensäuren aus dem Portalblut in die Hepatozyten transportiert (Hagenbuch et al., 1990; Hagenbuch et al., 1991). Unkonjugierte Gallensäuren werden von unspezifischen, Natrium-unabhängigen *organic anion transporting polypeptides* OATPs (*SLCO*-Genfamilie) in die Leberzellen transportiert (Hagenbuch und Meier, 2003; Roth et al., 2012). Das Zusammenspiel der verschiedenen Transportsysteme des Enterohepatischen Kreislaufs ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

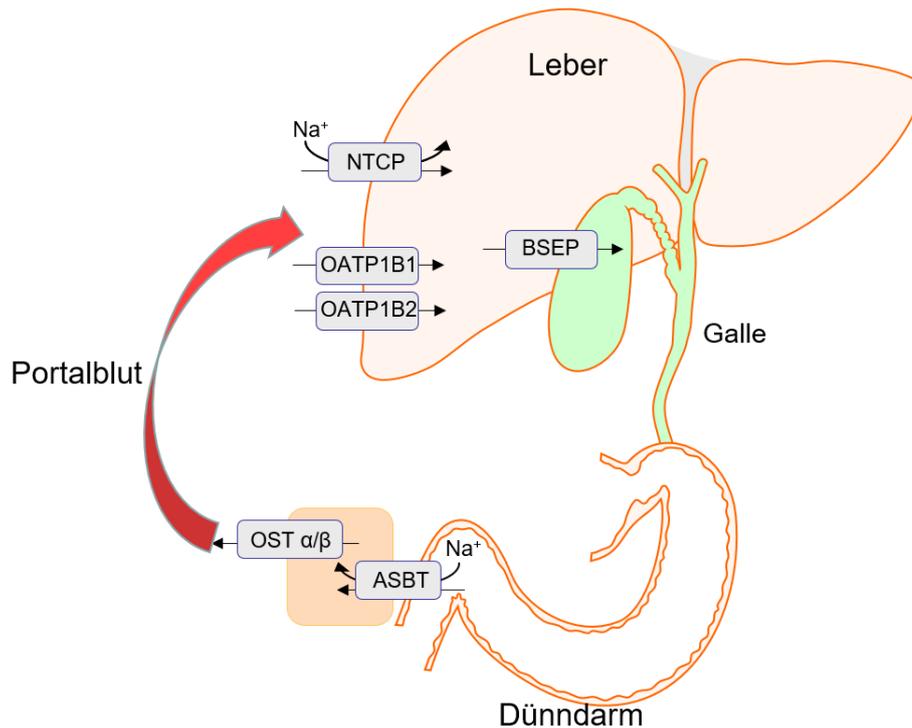


Abbildung 1-2: Die wichtigsten Transportsysteme des Enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren

Der Enterohepatische Kreislauf ermöglicht eine effektive Zirkulation von Gallensäuren zwischen dem Darm und der Leber. Gallensäuren werden aktiv von BSEP in die Galle überführt und gelangen in den Dünndarm. Im terminalen Ileum wird ein Großteil der Gallensäuren von ASBT im Ko-Transport mit Natrium in die Enterozyten aufgenommen und von OST α/β in das Portalblut überführt. Konjugierte Gallensäuren werden anschließend von NTCP im Ko-Transport mit Natrium über die Basalmembran der Hepatozyten transportiert. Für unkonjugierte Gallensäuren wird diese Funktion von OATP1B1/B2 übernommen.

1.9 Die Struktur der Zelle

Im Folgenden sollen die wichtigsten Zellorganellen kurz in ihrer Funktion und ihren Besonderheiten vorgestellt werden sowie ein kurzer Zusammenhang zum Gallensäurestoffwechsel aufgezeigt werden.

Zellkern

Der Zellkern ist in den meisten eukaryotischen Zellen die größte Zellorganelle und trennt das Genom und die an der Transkription beteiligten Moleküle vom Zytoplasma. Größe, Anzahl und Morphologie der Zellkerne variieren stark abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Die Hülle des Zellkerns besteht aus zwei Doppellipidmembranen, der äußeren und der inneren Kernmembran, die durch einen etwa 30-50 nm breiten peri-nuclearen Spalt getrennt sind. Die äußere Kernmembran geht in das ER über und ist mit der inneren Kernmembran an den Kernporen verbunden. Die Kernporen ermöglichen einen relativ freien Transport von Molekülen zwischen Kern und ER, mit einer Größenbeschränkung in Abhängigkeit von der

Größe der Kernporen. Die Kernmembranen sind besetzt mit einer Vielzahl von teils noch unbekannt Proteinen. Angrenzend an die innere Kernmembran findet sich eine bis zu 100 nm dicke Proteinschicht, die Kernlamina, die hauptsächlich struktur- und funktionsprotektive Aufgaben hat. Innerhalb dieser Begrenzung liegt die eigentliche DNA größtenteils dicht gepackt als Heterochromatin und in den transkriptionsaktiven Bereichen als Euchromatin vor. Gestützt wird die DNA vom Kernskelett, das Parallelen zum Zytoskelett außerhalb des Zellkerns aufweist (Burke und Ellenberg, 2002; Lammerding, 2011; Pederson, 2011).

Die Interaktion von Gallensäuren und Kernrezeptoren, wie z.B. dem Farnesoid-X Rezeptor, findet direkt im Zellkern statt. Sowohl konjugierte als auch unkonjugierte Gallensäuren erreichen das Innere des Zellkerns, allerdings unterscheiden sich die Konzentrationen der Gallensäuren im Kernplasma von denen im Zytoplasma. Bislang ist die Art und Weise, wie Gallensäuren in den Zellkern gelangen, nicht abschließend geklärt. Eine einfache Diffusion durch die Kernporen von weniger hydrophilen Gallensäuren ist sehr wahrscheinlich, allerdings gelangen auch sehr hydrophile Gallensäuren in den Zellkern. Die Hydrophilie bewirkt, dass die Gallensäuren hauptsächlich an Proteine gebunden im Zytoplasma vorliegen und einen anderen Mechanismus benötigen, um in den Kern zu gelangen. Diese Mechanismen konnten bislang jedoch noch nicht aufgedeckt werden (Mendoza et al., 2002; Monte et al., 2002; Monte et al., 2008).

Endoplasmatisches Retikulum (ER)

Direkt angelagert am Zellkern findet sich das membranöse ER. Von dort aus erstreckt es sich über die komplette Zelle und bildet die größte Zellorganelle. Hauptaufgaben des ER sind die Proteinbiosynthese und der anschließende Transport sowie die Faltung der Proteine, Teile des Fett- und Steroidstoffwechsels und die Regulation des intrazellulären Kalziumhaushalts. Die Bestandteile des ER sind die nukleäre Hülle und das periphere ER mit seinen Zisternen und Tubuli. Obwohl dieses System komplett zusammenhängend ist, sind einzelne Bereiche auf bestimmte Funktionen spezialisiert. Die nukleäre Hülle besteht aus zwei Doppellipidschichten, die mit Poren durchsetzt sind, um einen Austausch von Molekülen aus dem Zellkern sicherzustellen. Die Zisternen bestehen aus flachen Hohlräumen und können besetzt mit Ribosomen als raues ER und ohne Ribosomen als glattes ER vorliegen. Die tubulären Strukturen des ER sind der dynamische Anteil dieser Zellorganelle und befinden sich im ständigen Umbau. Obwohl jede eukaryotische Zelle ein ER besitzt, variiert das Verhältnis zwischen flachen Zisternen und den Tubuli je nach Spezialisierung der Zelle stark. Das ER sekretorisch aktiver Zellen, wie z.B. das der Inselzellen im Pankreas, besteht zum größten Teil aus flachen Zisternen und nur wenigen Tubuli und erbringt dadurch die hohe sekretorische Leistung der benötigten Proteine. Zellen, die auf Fettsynthese oder Kalzium-

Signalprozesse spezialisiert sind, wie einige Leber- und Muskelzellen, haben einen sehr hohen Anteil an tubulärem ER (Schwarz und Blower, 2015).

Hauptaufgabe des ER ist die Proteinbiosynthese. Diese wird im Zytosol initiiert und die Ribosomen docken zusammen mit der gebundenen mRNA an *signal recognition particle* (SRP) Rezeptoren an der cytosolischen Seite des ER an. Von hier werden die Proteine durch das Translokon, eine Pore, welche die Lipiddoppelschicht durchlässig hält, in das Lumen des ER synthetisiert. Membranproteine werden hier direkt in die Lipiddoppelschicht eingebaut. Hydrophobe Bereiche der Sequenz oder bestimmte Ankersequenzen werden erkannt und führen zu einem Synthesestopp, einem Umklappen des Proteins und somit zu einer Verankerung in der Membran. Ist die Translation beendet, führen in einigen Fällen Signalpeptidasen durch Erkennen kurzer Sequenzen zu einer Durchtrennung der Aminosäurekette und zur Freisetzung des Proteins. Von hier an werden weitere Faltungsprozesse durch Chaperone und Glykosylierungen im ER durchgeführt, bevor Proteine in das Zytosol oder zu anderen zellulären Strukturen weitergeleitet werden. In den tubulären Anteilen werden vor allem unterschiedlichste Membranlipide synthetisiert und an den Golgi-Apparat weitergeleitet. In diesen meist tubulären Strukturen finden auch Umbauprozesse der Gallensäuren Vorläufer statt. Der für diese Arbeit relevanteste Prozess ist die Aktivierung von Dihydroxykoprostansäure und Trihydroxykoprostansäure mit Coenzym-A durch FATP2 (Monte et al., 2009; Schwarz und Blower, 2015). Die dritte wichtige Aufgabe des ER ist die Regulierung des intrazellulären Kalziumhaushalts. Normale Ca^{2+} Konzentrationen im Cytosol liegen in etwa bei 100 nM (10^{-7} M), im ER und extrazellulär dagegen bei etwa 10^{-3} M. Über das im ER gespeicherte Ca^{2+} können durch das Öffnen verschiedener Kalziumkanäle Signale an das Zellinnere weitergegeben werden (Schwarz und Blower, 2015).

Der Golgi-Apparat

Dem ER als Modifikations- und Verteilungszentrum direkt nachgeschaltet ist der Golgi-Apparat. Proteine und Membranlipide werden über vesikuläre Transportsysteme aus dem ER ausgeschleust und zum aus gestapelten Zisternen aufgebauten Golgi-Apparat gebracht. Dem Zellinneren ist dabei die *cis*-Golgi Zisterne zugewandt, außenliegend befindet sich die *trans*-Golgi Zisterne und das etwas vorgelagerte *trans*-Golgi Netzwerk (TGN). Die Zisternen zwischen *cis*- und *trans*-Golgi werden als mediale Zisternen bezeichnet. Zellen können eine Vielzahl solcher Golgi-Stapel enthalten, die immer in dieser Ausrichtung angeordnet sind. Diese Ordnung wird nur während der Zellteilung aufgelöst. Hier wird der komplette Golgi-Apparat in Vesikel verpackt und gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt, wo sich die Zisternen anschließend wieder bilden. Innerhalb dieser Zisternen, bzw. entlang ihrer Membran, werden post-translationale Modifikationen wie N- und O-Glykosylierungen vorgenommen und Proteine durch Chaperone korrekt gefaltet. Anschließend verlassen

prozessierte Stoffe den Golgi-Apparat über die *trans*-Seite und das TGN um entweder in die Plasmamembran oder zu intrazellulären Bestimmungsorten sortiert zu werden (Matteis und Luini, 2008; Glick und Nakano, 2009; Huang und Wang, 2017)

Mitochondrien

Mitochondrien sind intrazelluläre Kraftwerke, die Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zur Verfügung stellen (Skulachev; Siekevitz, 1957). Dazu werden Zucker, Aminosäuren und Fette metabolisiert und als Pyruvat oder Coenzym A gebundene Fettsäuren den Mitochondrien zur Verfügung gestellt. Über den Zitratzyklus werden Elektronen auf NADH und FADH₂ übertragen und angereichert. Dieser Elektronengradient führt zu einem Potential, dessen Ausgleich in Form eines Protonenstroms genutzt wird um über die F₀F₁-ATPase Energie als Phosphorylierungsenergie auf ATP zu übertragen, welches von den Zellen genutzt werden kann (Spinelli und Haigis, 2018). Auch in der Gallensäuresynthese spielen Mitochondrien eine wesentliche Rolle. Das Enzym Steroid-27-hydroxylase (CYP27A1) ist in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert. CYP27A1 ist geschwindigkeitsbestimmend für den alternativen Gallensäuresyntheseweg und ist zusätzlich beteiligt an Zwischenschritten der Gallensäuresynthese über den klassischen Syntheseweg (Pandak et al., 2002; Monte et al., 2009).

Peroxisomen

Peroxisomen wurden erstmals 1954 als eigenständige Zellorganellen identifiziert (Rhodin, 1954) und 1965 als Peroxisomen beschrieben (Sabatini und Adesnik, 2013). Seitdem wurde in vielen Veröffentlichungen herausgestellt, dass die Abgrenzung von anderen membrangebundenen Organellen durchaus angebracht ist. Eine Vielzahl metabolischer Synthesewege, allen voran die β -Oxidation von Fettsäuren und die Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies verdeutlichen den Einfluss von Peroxisomen auf die physiologische Zellfunktion. Im Menschen wurden Krankheitsbilder, die durch genetische Mutationen peroxisomaler Enzyme ausgelöst werden, unter dem Begriff *peroxisomal biogenesis disorders* zusammengefasst. Dieses Krankheitsbild, zu dem z.B. das Zellweger-Syndrom zählt, führt zu Störungen der peroxisomalen Biogenese, was in der Regel nicht mit dem Leben vereinbar ist (Brown et al., 1982; Smith und Aitchison, 2013; Islinger et al., 2018). Peroxisomen sind umgeben von einer Doppellipidmembran und umfassen 0,1-1 μ m im Durchmesser. Bislang wurden zwei Entstehungswege von Peroxisomen beschrieben: Eine *de-novo* Synthese durch das Abschnüren und Reifen peroxisomaler Vesikel vom ER (van der Zand et al., 2012) und ein Wachstum mit anschließender Teilung der bestehenden Peroxisomen (Motley und Hetteema, 2007). Diese zwei Entstehungswege ermöglichen je nach Bedarf eine hohe Dynamik der zellulären Ausstattung mit Peroxisomen (Smith und Aitchison, 2013).

In Hepatozyten findet ein Teil der *de-novo* Gallensäuresynthese in Peroxisomen statt. Die im ER synthetisierten und an Coenzym-A gebundenen Gallensäurevorläufer Dihydroxykoprostansäure und Trihydroxykoprostansäure werden über Vesikel zu den Peroxisomen transportiert und dort von drei Enzymen zu Cholat und Chenodeoxycholot umgebaut. Anschließend werden diese primären Gallensäuren im Peroxisom durch BAAT an die Aminosäuren Taurin oder Glycin konjugiert und durch noch unbekannte Mechanismen aus den Peroxisomen ausgeschleust (Ferdinandusse und Houten, 2006).

Das endo-lysosomale Netzwerk

Unter dem Überbegriff des endo-lysosomalen Netzwerks sind intrazelluläre, membranumschlossene Feinstrukturen zusammengefasst, die maßgeblich an der Zellhomöostase, dem Recycling von Ressourcen, der Signalübertragung und Polarität von Zellen beteiligt sind. Zu diesen Strukturen zählen Endosomen und Lysosomen sowie die Zellorganellen, mit denen diese in ständigem Kontakt stehen. Durch Endozytose werden Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt, die im Durchmesser etwa 60 bis 120 nm groß sind und Bestandteile der extrazellulären Matrix sowie jegliche Membranbestandteile der abgeschnürten Membranregion geladen haben. Diese Ladung wird sofort einem Netzwerk aus hunderten Endosomen, den frühen Endosomen, zugeführt. Durch Fusion der Transportvesikel mit frühen Endosomen werden alle internalisierten Bestandteile übertragen und die Membranen verschmolzen. Die Vesikel, die den frühen Endosomen zugeführt werden, kommen dabei nicht nur von der Plasmamembran, sondern auch von intrazellulären Strukturen wie dem TGN. Durch das breite Aufgabenspektrum der frühen Endosomen ist eine weitere Unterteilung in Recycling-Endosomen und sortierenden Endosomen möglich. Um die Balance zwischen zugeführten Stoffen und Membrananteilen und der Größe der einzelnen frühen Endosomen zu regulieren, werden Stoffe bereits aus den frühen Endosomen bzw. Recycling-Endosomen über unterschiedliche Transportwege zur Plasmamembran zurückgebracht. Dies geschieht über schnelle Recycling-Wege an den tubulären Ausläufern früher Endosomen in der Nähe der Plasmamembran oder durch Bildung von sog. *endocytic recycling compartments* (ERC), welche wiederum in Kontakt mit dem TGN stehen. Stoffe, die nicht recycelt, sondern degradiert werden sollen, werden zu den späten Endosomen transportiert, welche im weiteren Verlauf zu *multivesicular bodies* (MVB) fusionieren. Dies geschieht über Vesikel, die von den frühen Endosomen abgetrennt werden und mit den späten Endosomen verschmelzen. MVB können in einigen Zelltypen mit der Plasmamembran fusionieren und zur Exozytose der Bestandteile führen. Meistens kommt es jedoch zu einer Verschmelzung mit Lysosomen und dem Abbau der internalisierten Bestandteile (Klumperman und Raposo, 2014; Hu et al., 2015; Naslavsky und Caplan, 2018).

Möglich wurde die Unterscheidung der beschriebenen Feinstrukturen im Zellinneren erst durch die Etablierung der Elektronenmikroskopie. Frühe Endosomen, späte Endosomen, MVB und Lysosomen lassen sich zum einen durch den unterschiedlichen Grad der Azidität unterscheiden, zum anderen auch über die unterschiedliche Zusammensetzung von Membranproteinen und Phospholipiden. Der intra-luminale pH-Wert des endo-lysosomalen Systems fällt in der oben genannten Reihenfolge ab. Haben frühe Endosomen einen pH-Wert im Bereich von 6,2, sinkt dieser auf etwa 5,5 in den späten Endosomen bis hin zu Werten von 4,5 in Lysosomen. Grund dafür sind ATP-getriebene Protonenpumpen in den Membranen der Endosomen und Lysosomen (Murphy et al 1984, Hu et al. 2015). Eine weitaus differenzierte Unterscheidung bieten Phospholipide und Membranproteine. Frühe Endosomen und deren sortierende Untereinheiten sind reich an Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI3P) und einigen Mitgliedern der Familie der GTP-bindenden Rab-Proteine (Rab4, Rab5, Rab10, Rab14 und Rab22). Recycelnde Endosomen und das ERC sind vor allem durch Rab11, Rab8 und Rab22a gekennzeichnet. Die Reifung von frühen Endosomen zu späten Endosomen wird oft durch den Wechsel von Rab5 zu Rab7 definiert. In den Übergangsformen der Endosomen finden sich oft beide Rab-Proteine und eine strikte Unterscheidung ist oft nicht möglich. Auch der Übergang von späten Endosomen zu Lysosomen ist fließend. Hier bieten Lysosomen-spezifische Membranproteine wie LAMP-1 und LAMP-2 eine Abgrenzungsmöglichkeit zu den bereits beschriebenen endosomalen Strukturen (Klumperman und Raposo, 2014; Villarroel-Campos et al., 2014; Hu et al., 2015; Naslavsky und Caplan, 2018).

1.10 Toxizität von Gallensäuren

Gallensäuren sind potentiell zytotoxische Substanzen. Zum einen hängt der Grad an Toxizität von der Konzentration im Gewebe ab, zum anderen stark von der jeweiligen Struktur der einzelnen Gallensäuren (Heuman, 1989; Hofmann, 1999). Grundsätzlich gilt, dass die Konjugation an Taurin und Glycin die Hydrophobizität aller Gallensäuren stark senkt, eine freie Diffusion durch Membranen praktisch unmöglich macht und so die Gallensäuren für den Körper zu kontrollierbaren Substanzen werden. Konzentrationen von Gallensäuren in der intrazellulären Matrix liegen unter physiologischen Umständen unter 1 µmol/l und verhindern so eine Toxizität. Dafür sorgen zytosolische Proteine, die Gallensäuren binden und die schnelle Elimination der aufgenommenen Gallensäuren durch Transportsysteme aus dem Zelllumen in die Gallenflüssigkeit oder das Portalblut gewährleisten. Unter cholestatischen Bedingungen übersteigt die Konzentration im Zellinneren die Bindungskapazität von Proteinen und die Transportkapazität der Efflux-Pumpen und führt zu Interaktionen mit Membranlipiden und Zellorganellen, die zur Apoptose oder Nekrose der Zellen führen können (Roberts et al., 1997; Rodrigues et al., 1998; Hofmann, 1999).

Der zweite Faktor ist die molekulare Struktur der Gallensäuren. Hier ist das Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Eigenschaften der amphipathischen Gallensäuren der entscheidende Faktor, der über das toxische Potential der einzelnen Substanzen bestimmt. Dihydroxy-Gallensäuren wie Chenodeoxycholat und Deoxycholat haben durch ihre starke Hydrophobizität und Retentionszeit ein hohes toxisches Potential. Im Gegensatz dazu ist Ursodeoxycholat eine hydrophile Gallensäure mit einem geringen toxischen Potential. Alle anderen Gallensäuren, wie z.B. Cholat, bewegen sich im Bereich zwischen diesen Extremen und führen erst bei erhöhten Konzentrationen zu zytotoxischen Reaktionen (Heuman, 1989; Hofmann, 1999; Palmeira und Rolo, 2004; Perez und Briz, 2009).

1.11 Zielsetzung

Seit der Einordnung von SLC10A5 in die SLC10-Familie und der ersten Veröffentlichung im Jahr 2007 (Fernandes et al., 2007) wurden große Fortschritte in der Charakterisierung des Proteins gemacht. Es konnte eine Verbindung zwischen SLC10A5 und der Gallensäurehomöostase hergestellt werden, zuletzt bestätigt durch die Verschiebung der Gallensäureprofile der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus im überladenen Gallensäurekreislauf in der Arbeit von Aretz (2015). Subzelluläre Lokalisation und molekulare Funktion, die Grundpfeiler der Charakterisierung des SLC10A5-Proteins, konnten jedoch nicht final geklärt werden. Neben dem Gewebeexpressionsprofil zeigten erste Untersuchungen auf zellulärer Ebene zwar eine intrazelluläre Expression, die im Gegensatz zu Plasmamembran-ständigen Gallensäuretransportern der SLC10-Familie wie NTCP und ASBT stand. Auf Grund unspezifisch bindender Antikörper und möglicherweise fehlsortierten SLC10A5-GFP-Konstrukten konnte die subzelluläre Lokalisation jedoch nicht abschließend aufgeklärt werden. Auch auf der funktionellen Seite des Proteins blieben Versuche, einen Transport zu zeigen, erfolglos.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte in der vorliegenden Arbeit zum einen die subzelluläre Lokalisation des Proteins in Gewebeschnitten von Mäusen mit einem selbst-generierten Antikörper näher untersucht werden. Das Gewebe von *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen bot dabei eine effektive Kontrolle der Spezifität des Antikörpers. Zum anderen sollte durch die Kolokalisation von SLC10A5 mit organellenspezifischen Markerproteinen in der Zellkultur eine Theorie zur subzellulären Lokalisation aufgestellt werden. Auf Ebene der molekularen Funktion von SLC10A5 wurden Methoden in den Fokus gesetzt, die, ergänzend zu den Ergebnissen von Aretz (2015), eine Transportfunktion für Gallensäuren bestätigen oder ausschließen sollten.

Ein weiterer Fokus der Arbeit sollte auf der *Slc10a5*^{-/-} Knockout Maus liegen. Im Pilotversuch von Aretz (2015) zeigten sich so massive Veränderungen der Gallensäureprofile unter

Cholatifütterung, dass eine komplette Kompensation des Gen-Knockouts unter Standardfütterungsbedingungen unwahrscheinlich war. Deshalb sollten Detailunterschiede im Gallensäurestoffwechsel von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen ohne äußere Beeinflussung oder Überladung des Enterohepatischen Kreislaufs untersucht werden. Basierend auf den Ergebnissen der subzellulären Lokalisation und molekularen Funktion, welche in den Kontext möglicher Veränderungen im Knockout-Mausmodell gesetzt wurden, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit eine Hypothese zur Funktion von SLC10A5 im Organismus aufzustellen.

2 Material

Das Auffüllen und Ansetzen jeglicher Puffer und Medien auf das beschriebene Volumen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O). Auf die Angabe von [™] und [®] wird in dieser Arbeit verzichtet, die meisten Produkte sind jedoch geschützt.

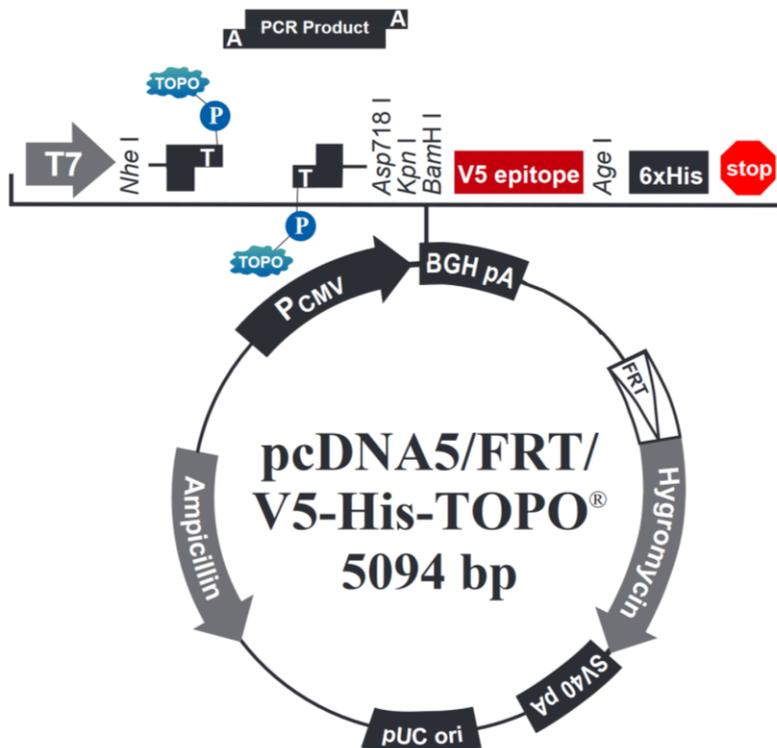
2.1 Molekularbiologische Materialien

2.1.1 PCR-Primer

Primer-Name	5' → 3' Sequenz	T _m [°C]	Verwendung
mp5-180bp-f	GGCTTAGCAGGTGCATTTTCACG	64	Genotypisierung der <i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout-Mauslinie
mp5-180bp-r	AGCCAAGTAGATGCCCACGAAC	64	
mP5-NEO3-a-f	GCAGCGCATCGCCTTCTATC	63	
mP5-PCR-m-L-r	CAAATGCTCCAGGGAGGTAGCCA	66	

2.1.2 Vektoren

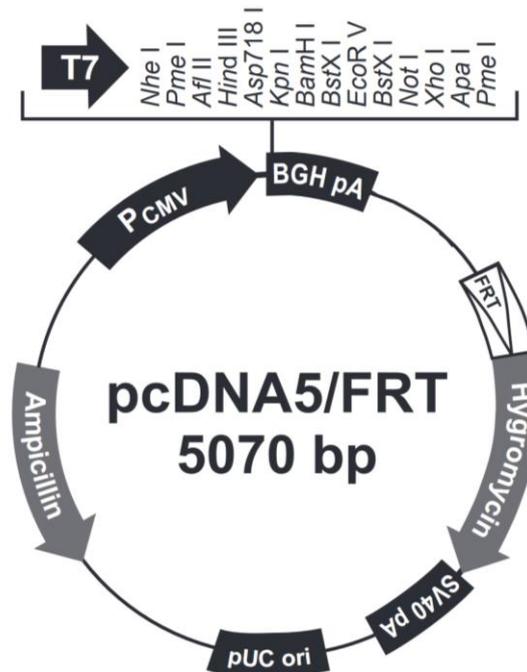
- pcDNA5-FRT/V5-His-Topo Invitrogen, Carlsbad, USA



Länge: 5094 bp

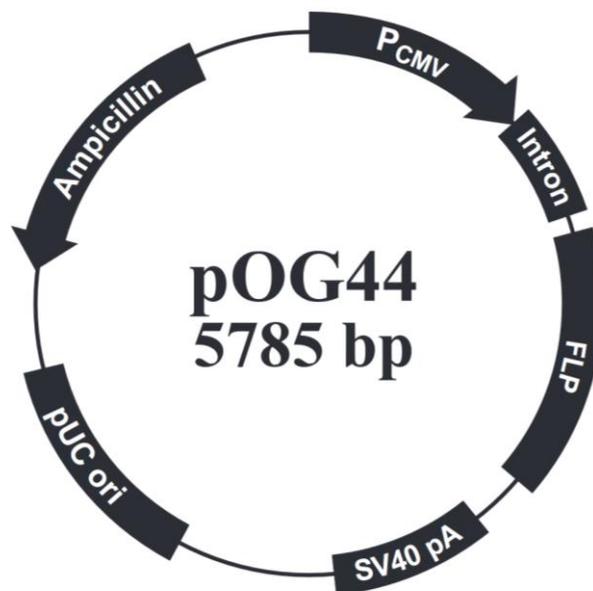
CMV promoter, T7 promoter, TOPO-Klonierungsstelle, V5-Epitop, Polyhistidin (6x His)-Region, BGH-PolyA, FRT-site, SV40 early polyA, pUC origin *bla*-Promotor, Hygromycinresistenz, Ampicillinresistenz

- **pcDNA5/FRT** **Invitrogen, Carlsbad, USA**



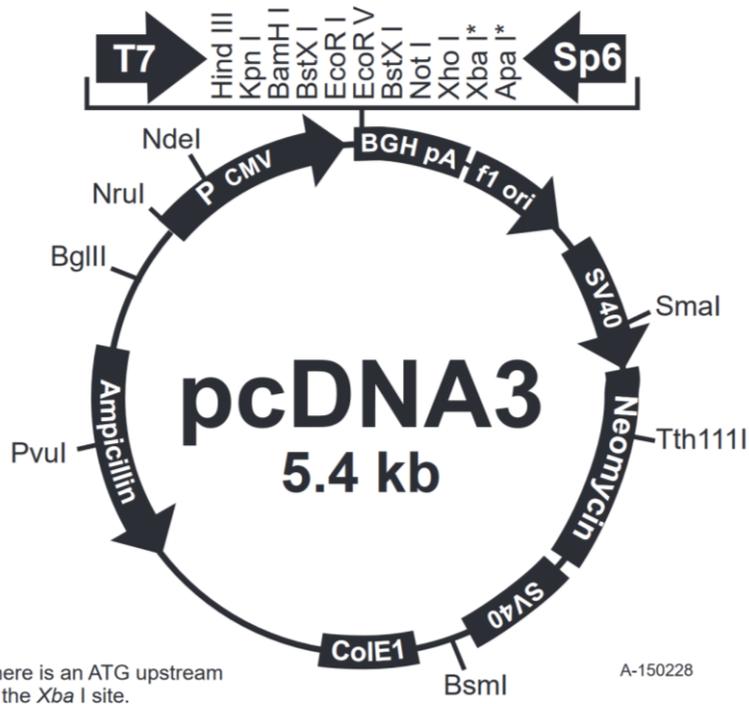
Länge: 5094 bp
 CMV promoter, T7 promoter, BGH-PolyA, FRT-site, SV40 early polyA, pUC origin *bla*-Promotor, Hygromycinresistenz, Ampicillinresistenz

- **pOG44** **Invitrogen, Carlsbad, USA**



Länge: 5785 bp
 CMV-Promoter, Leserahmen der Fip Recombinase (FLC), SV40, PolyA, pUC origin, *bla*-Promotor, Ampicillinresistenz, synthetisches Intron,

- **pcDNA3.1 (+)** **Invitrogen, Carlsbad, USA**



Länge: 5446 bp

CMV promotor, T7 promotor, BGH-PolyA, SV40 early polyA, pUC origin, *bla*-Promotor, Neomycinresistenz, Ampicillinresistenz

SLC10A5-Konstrukte

hSLC10A5-pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (SLC10A5-V5)

Der vollständige Leserahmen des humanen SLC10A5 wurde ohne Stoppcodon aus dem hSLC10A5-pcDNA6.2/c-EmGFP-Plasmid in den pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO-Vektor subkloniert. (Erstellt von Frau Dr. Stephanie Schmidt)

hSLC10A5-mScarlet-pcDNA5/FRT-mScarlet (SLC10A5-mSc)

Der vollständige Leserahmen des humanen SLC10A5 wurde ohne Stoppcodon Codon-optimiert durch eine flexible Verbindungssequenz mit dem kompletten Leserahmen von mScarlet ohne Startcodon im pcDNA 3.1(+)-Vektor bestellt (BioCat, Heidelberg) und in den pcDNA5/FRT-Vektor subkloniert.

hSLC10A5-C-Terminus-NTCP-FLAG-pcDNA5/FRT (SLC10A5ctNTCP)

Der C-Terminus von SLC10A5 wurde mit dem C-Terminus von NTCP ohne Stoppcodon ersetzt und ansonsten als vollständiger Leserahmen im pcDNA 3.1(+)-Vektor bestellt (BioCat, Heidelberg). An das C-terminale Ende wurde ein FLAG-*tag* (DYKDDDDK) mit darauffolgendem Stoppcodon eingesetzt. Dieses Konstrukt wurde in den pcDNA5/FRT-Vektor subkloniert.

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme

Name	Sequenz	Puffer	Hersteller
<i>DpnI</i>	$\frac{GA^TC}{CT^AG}$	buffer Tango	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>KpnI (fast digest)</i>	$\frac{GGTAC^C}{C^CATGG}$	universal fast digest buffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>XhoI</i>	$\frac{C^TCGAG}{GAGCT^C}$	universal fast digest buffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

DNA-Polymerasen

Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Scientific, Waltham USA
Taq DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas, Darmstadt

DNA-Ligasen

T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Carlsbad USA
---------------	--------------------------

Reverse Transkriptase

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Carlsbad USA
--	--------------------------

Weitere Enzyme

CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	Thermo Scientific. Waltham USA
DNase I	Thermo Scientific. Waltham USA

2.1.4 Bakterienstämme

- One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* Life Technologies

2.1.5 Quantitative *real-time* PCR TaqMan Gene Expression Assays

Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

Gen	TaqMan Assay Bezeichnung
<i>Abcb11 (Bsep)</i>	Mm00445168_m1
<i>Cyp27a1</i>	Mm00470430_m1
<i>Cyp7a1</i>	Mm00484150_m1
<i>Cyp7b1</i>	Mm00484157_m1
<i>Cyp8b1</i>	Mm00501637_s1
<i>Frap1 (Mtor)</i>	Mm00444968_m1
<i>Nr1h4 (Fxr)</i>	Mm00436419_m1
<i>Slc10a1 (Ntcp)</i>	Mm00441421_m1
<i>Slc6a6 (Taut)</i>	Mm00436909_m1
<i>Slc10a5</i>	Mm02345249_s1

Die Assays enthalten jeweils zwei unmarkierte Amplifikationsprimer und eine FAM-markierte TaqMan MGB (Minor Groove Binder) Sonde.

Alle Assays wurden aus Liste der vorgefertigten Primer ausgesucht, welche von Applied Biosystems zur Verfügung gestellt wird (www.thermofisher.com). Alle Assays sind, durch das Präfix *Mm* gekennzeichnet, Maus-spezifisch. Die Endung *_m* steht für eine Sonde, die auf der Exongrenze zweier benachbarter Exone liegt. Somit wird verhindert, dass genomische DNA detektiert wird. Die Endung *_s* bedeutet hingegen, dass die Sonde innerhalb eines Exons liegt. Der Grund hierfür ist, wie am Beispiel *Slc10a5*, dass das Protein auf nur einem Exon codiert wird.

Weitere Komponenten

TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase

- AmpliTaq Gold DNA Polymerase
- dNTPs mit dUTP
- Referenzfarbstoff ROX
- Pufferkomponenten

Life Technologies, Carlsbad USA

2.1.6 Gelelektrophorese

- Puffer

10 x TAE-Puffer

Tris	400 mM	48,3 g
Essigsäure		11,4 ml
0,25 M EDTA, pH8,0	100 mM	40 ml
ddH ₂ O		ad 1 l

- 1 % Agarosegel

Agarose		1 g
1x TAE-Puffer		100 ml

- Längenstandards

GeneRuler DNA Ladder Mix	Fisher Scientific, Waltham USA
GeneRuler Low Range DNA Ladder Mix	Fisher Scientific, Waltham USA

- GelRED-Färbelösung

GelRED (Biotium)	300 µl
1 M NaCl	100 ml
ddH ₂ O	900 ml

2.1.7 Kommerzielle Kits und Reagenzien für die Molekularbiologie

Maxwell RSC simply RNA tissue Kit	Promega, Mannheim
Super Script III First Strand Synthesis System for RT-PCR	Fisher Scientific, Waltham
Quik Change II Site-directed mutagenesis Kit	Fisher Scientific, Waltham
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Hilden
Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Fisher Scientific, Waltham
QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies. Santa Clara
RNase away Reagent	Ambion, Kaufungen
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden

2.1.8 Puffer und Medien

- LB-medium (1 L)

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
ddH ₂ O	ad 1 L

Das LB Medium wird mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Vor Gebrauch werden entsprechend der Anforderungen Selektionsmedien hinzugefügt.

- LB-Agar (1 L)

LB-Medium	1 L
Agar-Agar	20 g

Autoklavieren und auf ca. 60°C abkühlen lassen (bis es anfassbar ist). Selektionsmedien hinzufügen und Platten unter einer Sterilwerkbank gießen.

- SOC Medium

Trypton	2 %
Yeast-Extract	0,50 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

2.2 Zellkultur

Zelllinien

Flp-In T-Rex 293 (Invitrogen, Karlsruhe)

Flp-In T-Rex 293 Zellen basieren auf *Human Embryonic Kidney Cells* (HEK293) und weisen als Besonderheit eine stabil integrierte FRT-site auf und exprimieren konstitutiv den Tet-Repressor. Ursprünglich wurde diese Zelllinie aus den Nieren eines abortierten Fötus gewonnen und bekam ihren Namen durch die Nummer des Experimentes (293) aus dem der Originale Zell Klon hervorging (Graham et al., 1977). HEK293 Zellen wachsen adhärent einschichtig und besitzen wenig Zytoplasma. Sie können kurze Ausläufer ausbilden und mit den Antibiotika Zeocin auf die FRT-site und Blasticidin auf das Tet-Repressor-Gen selektioniert werden.

GripTite 293 MSR Zellen (Life Technologies)

Auch diese Zelllinie basiert auf HEK293 Zellen. Besonderheit ist hier die Expression des *human macrophage scavenger receptor type 1* (MSR1). Dieser MSR Rezeptor bedingt eine sehr hohe Adhärenz im Vergleich zu normalen HEK293 Zellen.

HepG2

HepG2 Zellen sind immortalisierte Zellen eines humanen hepatozellulären Karzinoms, die im Jahre 1979 aus der Leber eines 15-jährigen argentinischen Jungen isoliert wurden (Aden et al., 1979). Sie zeigen ein einschichtiges adhärentes Wachstum und weisen in Teilen Eigenschaften normaler Leberzellen auf.

Huh-7

Huh-7 ist eine ausdifferenzierte Leberzelllinie die ursprünglich aus einem Leberzellkarzinoms eines 57 Jahre alten Japaners im Jahre 1982 gewonnen wurde (Nakabayashi et al., 1982). Charakteristika dieser Zelllinie sind das epitheliale Wachstum in adhärennten einschichtigen Lagen. Die wohl wichtigste Mutation der Huh-7 Zelllinie ist eine Punktmutation des p53 Gens.

Puffer und sonstige Medien

HEK293-Medium (200 ml)

DMEM (high glucose)		87 ml
Hams F12		87 ml
FKS	10 %	20 ml
L-Glutamin (200 mM)	4 mM	4 ml
Pen/strep (10000 I.E./ml/10 mg/ml)		5 ml

HepG2-Medium (200 ml)

DMEM (<i>high glucose</i>)		178 ml
FKS	10 %	20 ml
Pen/strep (10000 I.E./ml/10 mg/ml)	1 %	2 ml

Huh-7-Medium (200 ml)

DMEM (<i>high glucose</i>)		178 ml
FKS	10 %	20 ml
Pen/strep (10000 I.E./ml/10 mg/ml)	1 %	2 ml

HEPES-Puffer

HEPES	18 mM	4,77 g	
NaCl	120 mM	7,07 g	
KCl	5 mM	0,4 g	
KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,06 g	
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	0,3 mM	0,08 g	
Glucose	6 mM	1 g	
Phenolrot	0,03 mM	0,01 g	
EDTA	1 mM	0,37 g	
ddH ₂ O		ad 1 L	pH 7,3 einstellen

Trypsinlösung

Trypsin	0,025 %	25 mg
HEPES-Puffer		100 ml

Trypanblau

Trypanblau	4 %	4 g
NaCl	0,9 %	0,9 g
ddH ₂ O		ad 100 ml

Beschichtungsmedium für HEK293-Zellen

Poly-L-Lysin	100 µg/ml	in PBS
--------------	-----------	--------

Beschichtungsmedium für HepG2-Zellen

Rattenschwanz-Kollagen	2 ml
PBS	48 ml

Einfrriermedium

Standardmedium der jeweiligen Zelllinie	90 %
DMSO	10 %

Transfektionsreagenzien

- Lipofectamine 2000 Transfection Reagent
Für HEK293- und Huh-7 Zellen
Fisher Scientific, Waltham USA
- X-tremeGENE 9 Transfection Reagent
Für HepG2-Zellen
Sigma-Aldrich, St. Louis USA

Antibiotika

- Blastidicin (Roth, Karlsruhe) für die Selektion auf den Tet-Repressor (15 µg/ml)
- Geneticin G418 (Roth, Karlsruhe) für die Selektion auf den MSR (600 µg/ml)
- Hygromycin B (Roth, Karlsruhe) für die Selektion der Inserts (150 µg/ml)
- Tetrazyklin Hydrochlorid (Roth, Karlsruhe) für die Induktion der Proteinexpression (10 µg/ml)

2.3 Mikroskopische Verfahren

2.3.1 Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen

10 x PBS (1L)

NaCl	1380 mM	80 g
KCl	27 mM	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	100 mM	26,8 g
KH ₂ PO ₄	18 mM	2,4 g

pH 7,4 mit HCl einstellen und autoklavieren

2 % PFA (50 ml), phosphatgepuffert

PFA	2 %	1 g
1 x PBS (50 bis 60°C)		50 ml

Unter rühren auf 50°C erhitzen und 1 bis 2 Tropfen NaOH dazugeben bis eine Lösung des Pulvers eintritt, pH 6,8 bis 7,2 mit HCl einstellen

Puffer A (110 ml)

Glycin	20 mM	165,22 mg
1 x PBS		110 ml

Puffer B (70 ml)

BSA	1 %	700 mg
Puffer A		70 ml
Triton-X-100 (wenn Permeabilisierung erwünscht)		20 µl

Blockierlösung (70 ml)

Serum der Spezies, in der der 2. Antikörper generiert wurde	4 %	2,8 ml
Puffer B		67,2 ml

DAPI/PBS 1:5000

DAPI (1 mg/ml in ddH ₂ O)		50 µl
PBS		250 ml

Eindeckelmedium ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies)

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur etwa 10 µl pro Deckgläschen blasenfrei vorlegen und 24 h bei Raumtemperatur trocknen
Die Lagerung der eingedeckelten Objektträger erfolgt danach dunkel bei 4°C

2.3.2 Immunfluoreszenz an Cryoschnitten

Perfusionsfixierung und Schnitterstellung und Färbung

4 % PFA (50 ml), phosphatgepuffert (einlegen der entnommenen Organe)

PFA	4%	20 g
1 x PBS (50 bis 60°C)		500 ml

Unter rühren auf 50°C erhitzen und 1 bis 2 Tropfen NaOH dazugeben bis eine Lösung des Pulvers eintritt, pH 6,8 bis 7,2 mit HCl einstellen

Sucroslösung (zum Auswaschen des PFA und Cryoprotektion)

Sucrose (für 10 % Lösung)		10 g
Sucrose (für 20 % Lösung)		20 g
Sucrose (für 30 % Lösung)		30 g
0,1 M Phosphatpuffer		ad 100 ml

Phosphatpuffer Stocklösung A

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,2 M	27,6 g
ddH ₂ O		ad 1 L

Phosphatpuffer Stocklösung B

Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 M	53,6 g
ddH ₂ O		ad 1 L

0,1 M Phosphatpuffer

Stocklösung A	720 ml
Stocklösung B	280 ml
ddH ₂ O	1000 ml

Gefriermedium für Organe

Tissue-Tek O.C.T. Compound	VWR, Darmstadt
----------------------------	----------------

10 x TBS (1 L)

NaCl	1370 mM	12,1 g
Tris	100 mM	121,2 g
ddH ₂ O		ad 1L

pH auf 8,0 mit HCl einstellen und vor der Verwendung 1:10 verdünnen für 1 x TBS

1 x TBS-T (1L)

1 x TBS		1 L
Tween 20	0,05 %	121,2 g

Blockierlösung 10 %

TBS-T		9 ml
Serum der Spezies des 2. Antikörpers	10 %	1 ml

Antikörperlösung

TBS-T		4,95 ml
Serum der Spezies des 2. Antikörpers	1 %	50 µl
Triton-X-100	0,1 %	5 µl
Antikörper		

Sonstige Materialien

Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides	Fisher Scientific, Waltham, Ma
Deckgläser 24 mm x 50 mm	Roth, Karlsruhe
Dako Pen	Agilent, Santa Clara, Ca

Primärantikörper

Name	Epitop	Spezies	Hersteller
Anti-HA	YPYDVPDYA	polyklonal Kaninchen	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Flag	DYKDDDDK	polyklonal Kaninchen	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Anti-V5	GKPIPPELLGLDST	monoklonal Maus	Invitrogen, Camarillo, USA
CD107a (LAMP-1) Alexa Fluor 594- Konjugat	N-Terminus von LAMP-1	monoklonal Maus	Life Technologies, Carlsbad, USA

Sekundärantikörper

Name	gerichtet gegen	Spezies	Hersteller
Alexa Fluor 594	Kaninchen IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488	Maus IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 555	Kaninchen IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Invitrogen, Karlsruhe

2.3.3 Live Cell Imaging

Organellenmarker

Die Organellenmarker sind Teil des Cell Light BacMam 2.0 Systems von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Diese Zellorganellenmarker sind organellenspezifische Proteine, die an das fluoreszierende emGFP gekoppelt sind und über ein Baculovirus System mit einem Säugetierpromotor exprimiert werden. Die folgende Auflistung zeigt die Organelle und das jeweilige spezifische Protein:

Plasmamembran	Myristolylierungs-/ Palmytoylierungssequenz der Lck Tyrosin Kinase
Endoplasmatisches Reikulum	Calreticulin, KDEL
Golgi-Apparat	N-Acetylgalactosaminyl-Transferase
Mitochondrien	E1 Alpha Pyruvat Dehydrogenase
Mikrotubuli	Tubulin
Peroxisomen	Peroxisomale Signalsequenz 1, PTS1
Frühe Endosomen	Rab5a
Späte Endosomen	Rab7a
Lysosomen	Lysosomal-associated membrane protein 1 (Lamp1)

2.4 Transportmessungen

Radioaktiv markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität [Ci/mmol]	Konzentration [mol/L]	fmol/dpm
[³ H]Cholat	30	3,33 x10 ⁻⁵	0,015015
[³ H]Deoxycholot	38	3,68 x10 ⁻⁵	0,011962
[³ H]Glycochenodeoxycholot	14	7,14 x10 ⁻⁵	0,032175
[³ H]Glycodeoxycholot	29	3,79 x10 ⁻⁵	0,015533
[³ H]Glycoursodeoxycholot	14	10 x10 ⁻⁵	0,032175
[³ H]Taurin	20	5 x10 ⁻⁵	0,022523
[³ H]Taurochenodeoxycholot	10	5 x10 ⁻⁵	0,045045
[³ H]Taurocholot	10	5 x10 ⁻⁵	0,045045
[³ H]Taurodeoxycholot	29	2,76 x10 ⁻⁵	0,015533
[³ H]Tauroolithocholot	20	0,55 x10 ⁻⁵	0,022523
[³ H]Taoursodeoxycholot	14	9,29 x10 ⁻⁵	0,032175
[³ H]Ursodeoxycholot	12	13,33	0,037538

Die verwendeten Tritium-markierten Gallensäuren wurden zur Verfügung gestellt durch Herrn Prof. Dr. Alan F. Hofmann, University of California, San Diego, USA. Taurolithocholat wurde aus Tritium-markiertem Taurin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin durch Dr. Gary Grosser und Michael Kirstgen synthetisiert.

Substanzen („kalt“)

Cholat	Sigma, St. Louis, USA
Deoxycholol	Sigma, St. Louis, USA
Glycochenodeoxycholol	Sigma, St. Louis, USA
Glycodeoxycholol	Sigma, St. Louis, USA
Glycoursodeoxycholol	Sigma, St. Louis, USA
Taurin	Roth, Karlsruhe
Taurochenodeoxycholol	Sigma, St. Louis, USA
Taurocholol	Roth, Karlsruhe
Taurodeoxycholol	Sigma, St. Louis, USA
Taurolithocholat	Roth, Karlsruhe
Tauroursodeoxycholol	Sigma, St. Louis, USA
Ursodeoxycholol	Calbiochem, La Jolla, USA

2.4.1 Transportmessungen im 24-Well Format

Messpuffer

Na⁺-haltiger Transportpuffer

NaCl	142,9 mM	8,35 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
HEPES	20 mM	4,777 g
CaCl ₂ (200 mM Lösung)	1,8 mM	9 ml

Na⁺-freier Puffer

Cholinchlorid	142.9 mM	19,95 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
HEPES	20 mM	4,777 g
CaCl ₂ (200 mM Lösung)	1,8 mM	9 ml

Lyse und Proteinbestimmung

Lysepuffer

NaOH	1 N	40,01 g
SDS	0,1%	1 g
ddH ₂ O		ad 1 L

Lösung C (je 96-Well Platte)

4% Na ₂ CO ₃	20 ml
1% CuSO ₄	0,8 ml
2% K-Na-Tartrat	0,8 ml

Folin-Lösung (je 96-Well Platte)

Folin Ciocateau's phenol reagent	1 ml
ddH ₂ O	3 ml

2.4.2 Vesikeltransport

Puffer

Natriumphosphatpuffer

Stocklösung A:	1 M NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	13,7 g in 100 ml ddH ₂ O
Stocklösung B:	1 M Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	26,6 g in 100 ml ddH ₂ O
Stocklösung C:	3,9 ml Stocklösung A + 6,1 ml Stocklösung B + 10 ml ddH ₂ O	
	Ergibt 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0	

Hypotonischer Puffer pH 7,0 (50 ml)

Stocklösung C	0,5 mM	50 µl
EGTA	0,1 mM	500 µl

Mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen. Direkt vor dem Versuch Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) hinzugeben.

Inkubationspuffer (TS-Puffer) (1000 ml)

Sucrose	250 mM	85,5 g
Tris/HCl	10 mM	1,2 g

pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 bzw. 5,5 einstellen und mit ddH₂O auf 1 L auffüllen.
Anschließend steril filtrieren.

KNO₃-Puffer für BSEP Vesikel

HEPES-Tris 100mM 2,383 g HEPES
pH auf 7,4 mit 1,7 M Tris einstellen und mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen.

KNO ₃	1 M	10,11 g
Sucrose	1 M	17,115 g

Finaler KNO₃-Puffer (1000 ml):

100 ml HEPES-Tris + 100 ml KNO₃ + 20 ml Sucrose
Mit ddH₂O auf 1 L auffüllen. Anschließend steril filtrieren.

2.5 Versuchstiere

Mäuse

C57BL/6Nx129SvEvBrd F1	TIGM, College Station, TX, USA
B6.129S5-Slc10a5 ^{tm1Lex}	Eigene Zucht, Zentrales Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen
C57BL/6NTac	Eigene Zucht, Zentrales Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums (BFS) unter SPF-Bedingungen gehalten. Die Haltung erfolgte in einem Zwölfstündigen Hell-/Dunkel-Zyklus bei 22°C und 50% relativer Luftfeuchte. Wasser und Futter (1324 Ratte/Maus Haltung 10 mm Pellets, Altromin) stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Perfusionsfixierung der Mäuse wurde unter dem Aktenzeichen GI 20/23 Nr. A 8/2013 geführt.

Die Tötung zur Organentnahme wurde unter der Meldenummer 639_M genehmigt.

Die Erhebung von Gewichts- und Futterdaten während des sechsmonatigen Untersuchungszeitraum konnte nach Absprache mit der Tierschutzbeauftragten der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen ohne Anzeige eines Versuchsvorhabens erfolgen, da kein Eingriff in die Routine-Haltung der Mäuse erfolgte. Basierend auf dem Routinewechsel der Käfige während der Haltung wurde das Erhebungsintervall gewählt.

Narkose

Ketamin 100 mg/ml	CP-Pharma, Burgdorf
Xylazin 2%	Ceva, Düsseldorf

2.6 Reagenzien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim
Agarose, Ultra Pure	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholinchlorid	Sigma, Taufkirchen
Collagen (Aus Rattenschwänzen)	Serva, Heidelberg
Coomassie blau R250	Serva, Heidelberg
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
D-MEM	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's modified eagle's medium	Sigma, Steinheim
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure- Na^+	Roth, Karlsruhe
EGTA, Ethylenglykol-bis-(2aminoethylethyl)- tetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (>99,8%)	Roth, Karlsruhe
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	Gibco, Karlsruhe
FKS, fetales Kälberserum	Sigma, Taufkirchen
Folin Reagenz	Sigma, Taufkirchen
Gel Red	Biotium, Hayward, USA
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Steinheim
HEPES	Roth, Karlsruhe
Immersion liquid Typ N (Mikroskop-Öl)	Leica, Wetzlar
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kaliumnitrat (KNO_3)	Roth, Karlsruhe
Kollagenase Typ-D	Roche, Mannheim
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe
MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA)	Thermo Fisher, Waltham USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mineralöl für die Molekularbiologie	Sigma, Steinheim
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, Na_2CO_3	Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
N-Methyl-D-glucamine	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Poly-D-Lysin	Sigma, Taufkirchen
ProLong Gold Antifade	Invitrogen, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Protein A Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rotiszint 22 eco Szintillatoröl	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, HCl	Roth, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig	Messer, Griesheim
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Tri Reagent	Sigma, Steinheim
Tris (Tris(hydroxymehtyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tween 20, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Roth, Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe

2.7 Verbrauchsmaterialien

µ-Slides, 8-well	ibidi, Martinsried
12,5 cm ² -Kulturschalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
150 cm ² -Kulturschalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
24-well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnbergrecht
25 cm ² -Kulturschalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
75 cm ² T-Flaschen	Sarstedt, Nürnbergrecht
75 cm ² -Kulturschalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
96-well ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
96-well-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnbergrecht
CryoPure Gefäße, 2 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Deckglaschen, 24 x 56 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Einwegkanüle	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Einwegskalpell	Megro, Wesel
FastPrep Lysin Matrix (diverse)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Filterpapier	diverse

MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate	Life Technologies, Darmstadt
Minivial	Perkin Elmer, Waltham, USA
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Objektträger Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau
PCR-tubes, 0,3 ml	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Petrischalen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße (1,5 – 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Einmalpipetten	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Einmalpipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter, 0,22 µm	Sarstedt, Nürnberg
Uvetten	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt, Nürnberg

2.8 Geräte

7300 real-time PCR-System	Applied Biosystems, Darmstadt
Absaughilfe VACUBOY	Integra Biosciences, Zizers, CH
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Klara, USA
Apollo (13) Cryo-Versorgungstank	Cryotherm, Kirchen/Sieg
Autoclav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav 3150 EL	Systec, Linden
Benchmark Microplate Reader	Bio-Rad, München
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner FIREBOY	Integrad Biosciences, Zizers, CH
CO ₂ -Inkubationsschrank MCO-19AIC (UV)	Panasonic, Kadoma, JP
CO ₂ -Inkubator Nuair US AutoFlow	Integra Biosciences, Zizers, CH
Divac 2.4L Vakuumpumpe	Leybold, Köln
Einbettautomat EG1160	Leica, Wetzlar
Einfrierbox CoolCell SV2	Biocision, San Diego, USA
Electrophorese-Kammer 14,5 cm x 6,5 cm	Werkstatt MZI, Gießen
Electrophorese-Kammer 35,5 cm x 11,0 cm	Werkstatt MZI, Gießen
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
Filter A4 UV (Ex: BP 360/40, BS: 400, Em: BP 470/40)	Leica, Wetzlar
Filter L5 (Ex: BP480/40, BS: 505, Em: BP 527/30)	Leica, Wetzlar
Filter Y3 (Ex: BP 545/30, BS:565, Em: 610/75)	Leica, Wetzlar

Fluoreszenzmikroskop DM5500B mit Software LAS AF6000 mit 3D Deconvolution für S/W-Kamera DFC340FX	Leica, Wetzlar
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409	Pharmacia, Freiburg
Gefriermikrotom CM050 S Kryostat	Leica, Wetzlar
Gelschlitten 12 cm x 18 cm und 7,5 cm x 5,0 cm	Werkstatt MZI, Gießen
HI 221 Calibration Check Mikroprozessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Homogenisator Ultraturrax T25	IKA, Staufen
IKA C200 Bombenkalorimeter	IKA, Staufen
Image Master	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
Inkubationsschüttler Professional 3500	VWR, Radnor, USA
Kühlzentrifuge 5471 R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer Combimag RCA	IKA, Staufen
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA, Staufen
Maxwell RSC Instrument	Promega, Madison, USA
Mikroskop Fluovert	Leica Wetzlar
Mikroskop M3Z	Wild, Heerbrugg
MP FastPrep 24	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70	Leica, Wetzlar
Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0,11-0.23	Leica, Wetzlar
Objektiv HCX PL FL 10x&0.25 PH1	Leica, Wetzlar
Objektiv NPLAN 5x/0.12	Leica, Wetzlar
Operationsbesteck	diverse
PCR-Kabine UVT-B-AR	Grant-bio, Cambridge, UK
Pipetten pipetman (0,1-10 µl, 0,2-2 µl, 1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe pipet4u Oasis	AHN Biotrechnologie GmbH, Nordhausen
Pipettierhilfe Pipettboy Acu	Integra Biosciences, Ziters, CH
Potter-Elvehjem PTFE Homogenisator mit diversem Equipment	Sigma, Steinheim
Refridgerated Vapor Trap	Savant, Holbrook, USA
Retsch ZM1 Zentrifugalmühle	Retsch, Haan
Savant Speed Vac SPD 111V	Savant, Holbrook, USA
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage 1.5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage 1.8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank Nu5437	Nuaire, Plymouth, USA
Software LAS für Farbkamera DFC 320	Leica, Wetzlar
Stickstofftank BIOSAFE	Cryotherm, Kirchen/Sieg

Streckwasserbad TFB 45	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Taumler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler ABI PRISM 7300	Applied Biosystem, Darmstadt
Thermocycler PeqStar 2x Gradient	PeqLab, Erlangen
Thermocycler Primus 96 advanced gradient	PeqLab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima L-100 XP	Beckman Coulter, Brea, USA
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vakuumpumpe Gel Pump GP110	Savant, Holbrook, USA
Vortex IKA Genius 3	IKA, Staufen
Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Waage AE 240 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen
Waage C-30 Microbalance	Cahn Instruments, Ceritos, USA
Waage Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich, CH
Wärmeplatte	Werkstatt MZI und BFS, Gießen
Wasserbad	Memmert, Schwalbach
Wasserbad Pura	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5910 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg

UHPLC-MS/MS Standards

Alle Standardsubstanzen inklusive der Deuterium-markierten internen Standards wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Avanti Polar Lipid (Alabaster, USA) und Steraloids (Newport, USA) bezogen. Standards für die Glycin-konjugierten Formen der α -, β - und ω -Muricholsäuren waren nicht kommerziell verfügbar und wurden anhand eindeutiger Parameter bestimmt (*m/z*, *retention time* und *fragmentation profile*).

2.9 Programme und Tools

BLAST, NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Datenbankbasierter Sequenzvergleich

ClustalW

www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html

Sequenzalignments

DNASTar Version 8.0.2, Lasergene, USA

EditSeq
SeqBuilder/Pro
MegAlign/Pro
Protean

Bearbeiten, Vergleichen und Visualisieren von Basen- und Aminosäuresequenzen

DoubleDigest

www.fermentas.com/doubledigest/index.html

Ermitteln der Bedingungen für Doppelrestriktionen

Tm Calculator

<https://www.thermofisher.com/>

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

FinchTV (Geospiza)

www.geospiza.com/finchtv/

Auswertung von Sequenzspuren

GraphPad Prism 4, San Diego, USA

Berechnung und Darstellung von Graphiken, statistische Auswertung

HUGO Gene Nomenclature Committee

<http://www.genenames.org/>

Nomenklatur humaner Gene

NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/

Datenbank für Literaturrecherche und Sequenzen

Microsoft Office 2016 (Word, Excel)

Schriftliche Ausarbeitung, Rohdatendokumentation und Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen

Citavi 6

<https://www.citavi.com/de>

Literaturverwaltung

3 Methoden

3.1 Allgemeine Methoden der Molekularbiologie

3.1.1 Isolation von RNA

Totale RNA aus Zellen und Gewebe wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden isoliert. Die erste davon ist die Isolation mittels Tri-Reagent. Dies ist ein Gemisch aus Guadininthyocyanat und Phenol, welches sich durch Zugabe von Chloroform oder 1-Brom-3-Chlorpropan nach Zentrifugation in drei Phasen mit unterschiedlichen Dichte- und Löslichkeitseigenschaften auftrennt. In der wässrigen oberen Phase verbleibt die RNA, in der mittleren Phase die DNA und in der unteren, organischen Phase die Proteine. So lassen sich RNA, DNA und Proteine aus einer Probe isolieren.

Um RNA mit Tri-Reagent aus Zellen zu isolieren, wurden etwa 5 Millionen Zellen auf einer 75 cm² Zellkultur Platte mit einem Schaber abgelöst, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 960 x g pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml Tri-Reagent durch Auf- und Abpipettieren lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 12.000 x g für 10 min bei 4°C herunterzentrifugiert und der Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zelllysate wurden für 5 min stehen gelassen, um Nukleinsäuren und Proteine dissoziieren zu lassen. Anschließend wurde 0,2 ml Chloroform dazugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt, und die Proben erneut für 10 min stehen gelassen. Um die verschiedenen Phasen zu trennen erfolgte die Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 min bei 4°C. Die in der oberen wässrigen Phase gelöste RNA wurde mit einer Pipette vorsichtig aufgezogen und in ein RNase-freies 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 0,5 ml Isopropanol zu je 1 ml Tri-Reagent-Ausgangslösung dazu pipettiert, kräftig geschüttelt und 10 min stehen gelassen. Der folgende Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g für 10 min bei 4°C pelletierte die gefällte RNA. Das Pellet wurde dann mit 2 ml 75%igem Ethanol gewaschen, das Ethanol wieder abgezogen und das Pellet unter Sichtkontrolle luftgetrocknet. Das Pellet wurde anschließend in DEPC-Wasser gelöst (10-50 µl). Die Konzentration wurde entweder im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) oder photometrisch bestimmt.

Die zweite Methode ist die Isolation von totaler RNA mittels paramagnetischer Metallpartikeln. Dazu wurde der Maxwell RSC von Promega in Kombination mit dem Maxwell RSC *simply RNA tissue kit* verwendet. Die RNA bindet dabei an die Metallpartikel welche über induzierten Magnetismus an den *plungern* haftend in verschiedene Fächer der Patronen überführt werden können. Nach mehreren Waschschritten wird die RNA dann im letzten Schritt in mindestens 50 µl ddH₂O eluiert. Die Homogenisierung der Proben erfolgte gewebe- und zellspezifisch in der 1-Thioglycerol enthaltenden Homogenisierungslösung bei 4°C. Bei den Gewebeproben wurde anschließend ein zusätzlicher Hitzeschritt für 2 min bei 70°C und Herunterkühlen auf

4°C zum besseren Aufschluss des Homogenats durchgeführt. Die Patronen wurden im Schlitten des Maxwell RSC befestigt und die *plunger* in das 8. Fach gesteckt. In Fach 4 wurden für Gewebeprobe 10 µl und für Zelllysate 5 µl DNase I hinzugefügt. Kurz vor dem Start des Isolationsprotokolls wurden 200 µl des Gewebe- bzw. Zellhomogenates mit 200 µl Lysepuffer gemischt und für 15 Sekunden auf einem Vortexer geschüttelt. Diese 400 µl konnten dann in das 1. Fach der jeweiligen Patrone überführt werden und das Isolationsprotokoll wurde gestartet. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

Qualitätskontrolle der RNA

Eine schlechte Qualität der RNA kann dazu führen, dass Sonden in der *real-time PCR* nicht spezifisch binden und es zu falschen oder nicht auswertbaren Ergebnissen kommt. Ein Grund dafür sind Verunreinigungen mit genomischer DNA. Sonden, die nicht Exon-übergreifend ansetzen, sondern innerhalb eines Exons binden führen zu falsch positiven Ergebnissen. Für SLC10A5 ist dieses Problem besonders relevant, da das Gen nur aus einem einzelnen Exon besteht und es keine Möglichkeit gibt, Sonden Exon-übergreifend anzusetzen zu lassen. Deshalb wurden alle RNA-Isolationen mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dieses Kapillarelektrophoresegerät fungiert als „*Lab-on-a-chip*“ und zeigt das klassische Bandenmuster einer RNA sowie die Maxima für 18S- und 28S-RNA im Chromatogramm. So lässt sich zum einen bestimmen wie stark fragmentiert die RNA ist, und zum anderen zeigen sich Verunreinigungen mit DNA. Zusätzlich berechnet das System automatisch einen RIN-Wert (*RNA integrity Number*). Dieser Wert liegt zwischen 0 und 10 und lässt eine vergleichbare Aussage über die Intaktheit der RNA zu, wobei der Wert 10 für eine nicht degradierte RNA steht (Schroeder et al., 2006).

Die Analyse wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im ersten Schritt wurden 65 µl Elektrophorese-Gel durch Zentrifugation der RNA-Gel-Matrix im mitgelieferten Filterröhrchen bei 1.500 x *g* für 10 min hergestellt. Die Färbung des Gels erfolgte mit 1 µl RNA-Färbekonzentrat. Der Chip wurde anschließend mit 9 µl des Gels und der mitgelieferten inversen Pipette, der Chip-Priming-Station, beladen. In die Wells für die Proben wurden danach je 5 µl RNA-Marker gefüllt und dann 1 µl RNA-Leiter oder RNA dazu gegeben. Die RNA wurde vorher auf 0,5 µg pro µl verdünnt und für 2 min bei 70°C hitzedenaturiert. Nach Zugabe aller Proben erfolgte die Analyse und Auswertung über die Agilent 2100 *Expert Software Suite*. Ausschließlich Proben mit einem RIN-Wert größer als 7,5 wurden für weitere Versuche verwendet.

3.1.2 Synthese von cDNA

Die Isolierte RNA wurde mithilfe der SuperScript III *Reverse Transcriptase* (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Diese konnte dann in den *real-time PCR*-Reaktionen eingesetzt

werden. Die genetisch modifizierte, reverse Transkriptase ermöglicht es, in Kombination mit unspezifisch bindenden oligo(dT) Primern, die totale RNA in cDNA zu kopieren. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentration von RNA und kopierter cDNA identisch sind.

Die Konzentration der RNA wurde auf 0,5 µg RNA pro 8 µl ddH₂O eingestellt und zusammen mit 1 µl oligo(dT) Primern und 1 µl 10mM dNTP-Mix für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Nach Herunterkühlen auf Eis wurden 2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase Out und 1 µl SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugegeben und im Thermocycler für 10 min bei 25°C, 50 min bei 50°C und 5 min bei 85°C inkubiert. RNA-Reste wurden mit 1µl RNase H bei 37°C für 20 min abgebaut.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentrationen von RNA- und DNA-Proben wurden spektralphotometrisch mit dem NanoDrop One^c (Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. 0,5 µl -2 µl der zu messenden Probe wurden auf den Sockel pipettiert und nach jeder Probe trocken sauber gewischt. Der NanoDrop gibt einen Wert für die Konzentration der RNA oder DNA sowie verschiedene Reinheitsverhältnisse aus. Das 260/280 Absorptionsverhältnis sollte für DNA bei etwa 1,8 liegen, für RNA bei etwa 2,0. Das 260/230 Verhältnis sollte mindestens einen Wert von 2,0 aufweisen (Wilfinger et al., 1997; Lucena-Aguilar et al., 2016). Luftblasen, die beim Pipettieren entstehen können, werden vom Gerät erkannt und die Messung als fehlerhaft gekennzeichnet

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine spezifische Amplifizierung von DNA Abschnitten. Dazu werden Primer generiert, die am 5' Ende bzw. am 3' Ende der gewünschten Region auf der DNA binden. Eine Polymerase synthetisiert dann unter den richtigen Bedingungen aus im Puffer verfügbaren dNTPs einen komplementären Strang. Ein PCR-Protokoll besteht immer aus einer Denaturierung des Doppelstrangs bei hohen Temperaturen gefolgt von einem Wechsel zu Temperaturen, die für die Anlagerung der jeweiligen Primer spezifisch sind, sowie einem anschließenden Schritt, bei dem das Temperaturoptimum der Polymerase gewählt wird um mit der Amplifikation zu beginnen. Um eine höhere Spezifität der Amplifikate zu gewährleisten wurden *Touchdown*-Protokolle durchgeführt, bei denen die Temperatur bei der Anlagerung initial 5°C über dem Optimum liegend gewählt und für 10 Zyklen um je 0,5°C gesenkt wurde. Anschließend konnte mit dem normalen PCR-Protokoll fortgefahren werden. Für die PCR wurde die *Phusion Flash II HiFi DNA-polymerase* (Thermo Fisher Scientific) im vorgemischtem Mastermix verwendet. Diese Polymerase hat eine „Proof Reading Funktion“ (3' → 5' Exonuclease Aktivität) um geringere Fehlerquoten bei der Amplifikation zu erreichen.

Primer-Design

Die Primer wurden mit SeqBuilder Pro (Lasergene) und dem von Thermo Fisher Scientific zur Verfügung gestellten T_m Calculator (www.thermofisher.com) erstellt. Die Schmelztemperatur T_m wurde im Bereich der Idealtemperatur der Polymerase (69°C – 72°C) gewählt bei einem GC-Gehalt von 30% bis 60% und einer Mindestlänge von 17 Nukleotiden. Komplementäre Bereiche beider Primer, die zu Dimerisierung führen können, wurden weitestgehend vermieden. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Metabion (Martinsried).

3.1.5 Mutagenese PCR

Für Mutagenesen wurde das *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) verwendet. Die *PfuUltra high-fidelity* DNA Polymerase elongiert die an die geschlossene, ringförmige DNA (*supercoiled*) bindenden revers-komplementären Primerpaare, ohne dass diese sich von der DNA lösen. Nach der Mutagenese-PCR werden die noch vorhandenen Ausgangsplasmide, mit Dpn I verdaut. Dpn I zeigt eine Endonucleaseaktivität für methylierte DNA und schneidet somit ausschließlich Plasmide, die zuvor mindestens einmal von Bakterien prozessiert wurden. Nach dem Verdau wird der Mutagenese Ansatz in chemisch kompetente TOP10 *E. coli* transformiert, wodurch die Lücken in den Plasmiden von den Bakterien repariert werden und eine Amplifikation stattfindet.

Primer-Design

Die Primersequenzen wurden mit Excel nach den Vorgaben des Mutagenese Kits erstellt. Zielvorgaben waren dabei eine Länge zwischen 25 und 45 Nukleotiden mit 10 bis 15 flankierenden Nukleotiden beidseits der Mutation, eine Schmelztemperatur von mindestens 78°C und einem GC-Gehalt von 40%. Optimalerweise endeten die Primer mit einem G oder einem C. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Metabion (Martinsried).

3.1.6 Real-Time PCR

Die Genexpression in Zell- und Gewebeproben wurde mit der *real-time PCR* quantifiziert. Dazu wurde das Applied Biosystems *real-time PCR*-System in Kombination mit Applied Biosystems TaqMan Assays (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Assays enthalten ein Primerpaar, welches spezifisch für das zu untersuchende Gen ist, sowie eine Sonde bestehend aus einem Farbstoff am 5'-Ende und einem nicht fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende. Zusätzlich enthalten modernere Sonden noch einen *Minor Groove Binder* (MGB) am 3'-Ende, der durch Anlagerung an die kleine Furche der DNA die Schmelztemperatur und somit Spezifität der Sonden bei der Bindung erhöht. Befinden sich Farbstoff und Quencher gebunden an die gleiche Sonde in räumlicher Nähe wird das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Während des

Anlagerungsschrittes der *real-time PCR* binden sowohl die Primer als auch die Sonden an den DNA-Strang der eingesetzten Probe. Anschließend baut die Taq-Polymerase durch ihre 5'-Endonuklease-Funktion die Nukleotide der Sonden ab und löst somit die räumliche Bindung zwischen Farbstoff und Quencher. Dadurch kann der eingesetzte Farbstoff, in dieser Arbeit FAM, nach Anregung eine Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 520nm emittieren, welche das *real-time PCR* -Gerät in Echtzeit messen kann. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Vervielfältigung der DNA an. Als Funktion gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen zeigt sich nach einer Phase, in der das Fluoreszenzsignal unter einer bestimmten Intensität ist, ein exponentieller Anstieg der Lichtemission mit abschließender Plateauphase. Der C_T -Wert (*Signal Threshold Cycle*), der als Genexpressionsmaß genommen wird, ist die Zahl des Zyklus, bei dem ein bestimmtes Fluoreszenzlevel während der exponentiellen Phase überschritten wird. Der C_T -Wert ist antiproportional zur Genexpression. Bezieht man den C_T -Wert eines Gens auf eine endogene Kontrolle, z.B. ein Haushaltsgen, lässt sich die relative Expression ΔC_T darstellen.

Zur besseren Veranschaulichung und Vergleichbarkeit wurden die ΔC_T -Werte transformiert und damit linearisiert. Die einfachste Form der Transformation ist der $2^{-\Delta C_T}$ -Wert. Erweitern kann man diese Umrechnung, indem man das am niedrigsten exprimierte Gen als Kalibrator benutzt. Dazu wird der ΔC_T -Wert des Kalibrators vom ΔC_T -Wert des Zielgens subtrahiert und der $\Delta\Delta C_T$ -Wert erhalten. Diesen kann wieder in $2^{-\Delta\Delta C_T}$ transformieren werden, was zu einer Darstellung der Expression als x-fache Expression des Kalibrators führt.

Die *real-time PCR* wurde am ABI Prism 7300 in 96-Well Platten durchgeführt. Der TaqMan Gene Expression Mastermix enthielt $MgCl_2$, dNTPs, Taq-Polymerase, einen internen Standard und Puffersubstanzen. In den TaqMan Gene Expression Assays waren Sonden und Primer als Konzentrat vorgemischt. Pro Ansatz wurden 25ng cDNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

12,5 μ l	TaqMan Gene Expression Mastermix
6,25 μ l	ddH ₂ O
1,25 μ l	TaqMan Gene Expression Assay
5 μ l	cDNA

Nach Verschließen der Platte mit einer Folie lief das PCR Protokoll am ABI Prism 7300:

Denaturierung	10 min	95°C	} 40x
Denaturierung	15 s	95°C	
Anlagerung und Fluoreszenzmessung	1 min	60°C	

Die Auswertung der Daten und Transformation der Werte erfolgte mit Microsoft Excel.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die negative Ladung, die jede DNA durch Ihre Phosphat-Reste trägt, ermöglicht eine Auftrennung im Spannungsfeld. Die DNA wandert dabei abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell vom Minuspol zum Pluspol. Als Trägersubstanz dient unter Hitze aufgelöste Agarose, die beim Abkühlen zu einem festen Gel wird. Die Agarosegele wurden, je nach zu erwartender Größe der DNA Abschnitte, 1%ig (>1000 bp) bis 2%ig (<500 bp) in 1x TAE-Puffer angesetzt. Der Gelschlitten mit dem abgekühlten Gel wurde anschließend in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gesetzt und der Kamm entfernt, um die Geltaschen freizulegen. Die Proben wurden vor dem Einbringen in die Geltaschen mit Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard dienten bei DNA-Fragmenten >1000 bp der *Gene Ruler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific) und bei Fragmenten <1000 bp die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific). Kleine Gele wurden bei 70mA, große Gele bei 150mA laufen gelassen bis der Bromphenolmarker das letzte Viertel des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend für 20 Min in GelRed gefärbt und mit dem Image Master bzw. über den Computeranschluss ausgewertet.

3.1.8 Gel-Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel wurde mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen) durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet die Belichtungszeit durch das UV-Licht so kurz wie möglich zu halten, um einer Schädigung der DNA entgegen zu wirken. Die ausgeschnittene Bande wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Das Gewicht der Bande sollte maximal 250 mg betragen. Basierend auf der Fragmentgröße wurde Puffer QX1 zum Gel-Stück gegeben: < 100 bp: 6 Volumen QX1 / 100 bp – 4 kb: 3 Volumen QX1 / > 4 kb: 3 Volumen QX1 + 2 Volumen ddH₂O.

Für ein 2 kb großes Fragment mit einem Gel-Gewicht von 200 mg mussten demnach 600 µl QX1 Puffer zugegeben werden. Anschließend wurden 11 µl QIAEX II Puffer dazugegeben und die Reaktionsgefäße für 10 min bei 50°C im Heizblock inkubiert. Dabei wurde die Agarose komplett gelöst und die DNA an Silica-Partikel im Puffer gebunden. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe für 30 s bei 1800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer QX1 resuspendiert und nochmals mit gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit 500 µl PE Puffer nach oben beschriebenem Schema. Anschließend wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Je nach Fragmentgröße variierten die Inkubationsbedingungen: < 4 kb: 5 min bei Raumtemperatur / 4 – 10 kb: 5 min bei 50 °C / > 10 kb: 10 min bei 50°C. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend

für 30 s bei 17.900 x g zentrifugiert und der Überstand mit der DNA in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.1.9 DNA-Klonierung

Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Bei der Klonierung von DNA über Restriktionsschnittstellen wird sowohl der Vektor in seiner *Multi-Cloning-Site* also auch das Gen, welches kloniert werden soll, mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Mittels einer Ligase lassen sich die zueinander komplementären Restriktionsschnittstellen verbinden und anschließend in *E. coli* reparieren. Im Idealfall werden 2 unterschiedliche Restriktionsenzyme gewählt, sodass sich die beiden Enden von Vektor und einzusetzendem Gen unterscheiden. Damit ist gewährleistet, dass das Gen in der richtigen Orientierung in den Zielvektor kloniert wird. Ausgewählt wurden die Enzyme mit SeqBuilder Pro (Lasergene). Die Restriktionsansätze wurden im Doppelverdau mit beiden Enzymen gleichzeitig durchgeführt. Um den richtigen Puffer und die richtige Konzentration der Enzyme zu wählen wurde der *DoubleDigest Calculator* (www.thermofisher.com) verwendet. Da die meisten Enzyme im für den Doppelverdau geeigneten *Tango Buffer* eine um 50% reduzierte Aktivität aufweisen, wurde die doppelte Enzymmenge eingesetzt. Bei *FastDigest* Enzymen wurde der mitgelieferte Standardpuffer mit ebenfalls doppelter Enzymkonzentration eingesetzt.

Puffer, Restriktionsenzyme und 1 µg Plasmid-DNA wurden mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und für 2 Stunden bei Standardenzymen und 10 min bei *FastDigest* Enzymen inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität für 20 min bei 80°C gestoppt. Zum restriktionsverdauten Vektoransatz wurde 1U *Calf Intestinal Alkaline* zugegeben um die Phosphatreste am 5'-Ende des linearisierten Vektors abzuspalten und eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Dafür inkubierte der Ansatz 5 min bei 50°C und es folgte eine erneute Hitzeinaktivierung bei 65°C für 15 min.

Ligation

Die Ligation der linearisierten Vektoren und Zielgene erfolgte mit der T4 DNA Ligase von Invitrogen. Die einzusetzende Menge an Vektor und Zielgen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{kb des Zielgens}}{\text{kb des Vektors}} \times \text{ng des Vektors} = \text{ng des Zielgens für ein molares Verhältnis von 1:1}$$

Das molare Verhältnis von Zielgen zu Vektor wurde 3:1 gewählt, weshalb das Ergebnis der oben beschriebenen Formel noch mit 3 multipliziert wurde. 4 µl Ligase Puffer, Zielgen, linearisierter Vektor und 1U T4 DNA Ligase wurden mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl der fertigen Ligation wurden für die Transformation in kompetente *E.coli* eingesetzt.

Transformation

Das Einbringen von Plasmiden in Bakterien erfolgte durch eine Hitzeschock Transformation. Das so aufgenommene genetische Material wird von den Bakterien vervielfältigt und kann nach der Wachstumsperiode, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, extrahiert und aufgereinigt werden. Chemisch kompetente TOP10 *E.coli* wurden dazu aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und sofort auf Eis gestellt um langsam aufzutauen. Sobald die Bakterienlösung eine hohe Viskosität beim vorsichtigen Schnipsen gegen das Reaktionsgefäß zeigte wurden bis zu 5 µl Plasmid-DNA zu den Bakterien pipettiert und die Zellen wurden für 30 min auf Eis ruhen gelassen. Nach den 30 Minuten erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 s im Wasserbad woraufhin die Zellen sofort wieder auf Eis überführt wurden. Nach etwa 2 min wurden 250 µl S.O.C-Medium zur Bakterienlösung gegeben und der Ansatz für 60 min bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Nach dieser Zeit konnte die Bakterienlösung auf Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsmedium in jeder gewünschten Verdünnung ausgestrichen werden. Die Platten wurden dann für 24 h zum Inkubieren in einem Brutschrank bei 37°C gelagert.

3.1.10 Plasmidpräparationen

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte in 2 unterschiedlich dimensionierten Ansätzen. Bei der Aufreinigung im Mini-Format wurden Ausbeuten von 8-15 µg Plasmid-DNA erzielt, bei der Aufreinigung im Midi-Format lagen die erzielten Mengen bei 300 – 500 µg.

Mini-Format

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien wurde das Quiagen Spin Miniprep Kit (Quiagen) verwendet. 4 ml LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. SLC10A5 Plasmide, welche teilweise schlechte Ausbeuten in der Mini-Präparation aufwiesen, wurden für mindesten 20 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und für 6 min bei 6.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die restlichen 2 ml der Bakteriensuspension wurden hinzugegeben. Die

Zentrifugation wurde wiederholt und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl *Resuspension Solution* gelöst. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl *Lysis Solution* und fünfmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Die Lyse wurde anschließend durch Zugabe von 350 µl *Neutralization Solution* und fünfmaliges Invertieren des Gefäßes gestoppt. Debris der Zellen wurde durch Zentrifugation bei 6.800 x g für 5 min abgetrennt, und der Überstand auf eine *QIAprep Spin Column* mit 2 ml Auffanggefäß überführt. Die Bindung der DNA erfolgte während einer 1-minütigen Zentrifugation bei 6.800 x g. Es folgten 2 Waschschriffe, die jeweils aus einer Zugabe von 500 µl *Washing Solution* und einer Zentrifugation bei 6.800 x g für 1 min bestanden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran durch einen erneuten Zentrifugationsschritt getrocknet. Abschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl *Elution Buffer* bedeckt. Nach 2-minütiger Inkubationszeit wurde die Säule erneut für 2 min bei 6.800 x g zentrifugiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung der Plasmid DNA erfolgte bei - 20°C.

Midi-Format

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien im Midi-Format erfolgte mit dem *QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit*. 35 ml LB-Medium wurden mit transformierten *E.coli* angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension 15 min bei 4°C und 4000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer *P1* resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml Puffer *P2* hinzugegeben und der Ansatz durch langsames Invertieren gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 4 ml Puffer *S3* und vorsichtiges Invertieren gestoppt und das Lysat wurde in eine mitgelieferte Filterspritze überführt. Der Ansatz wurde 10 min in dieser Spritze inkubiert, während auf die Säulen mit aufgesteckten Filtern und Extendern ein Vakuum angelegt wurde. Nach den 10 min Inkubationszeit wurde das Lysat in ein 50 ml Reaktionsgefäß gedrückt und mit 2 ml Puffer *BB* versetzt. Der Ansatz wurde in den Extender geschüttet und mit Hilfe des Vakuums durch die Säule gezogen. Die so gebundene Plasmid-DNA wurde 2-mal durch die Zugabe und das Absaugen von 700 µl Puffer *ETR* und Puffer *PE* gewaschen. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl ddH₂O bedeckt. Die Elution erfolgte für 2 min bei 16.000 x g bei Raumtemperatur. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei - 20°C.

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen nach der Sanger-Methode wurden von der Firma Microsynth SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Alle verwendeten Primer wurden von der Standardliste der Firma entnommen, meist repräsentiert durch den CMV-fwd und BGH-rev Primer, die das Insert in

allen verwendeten Vektoren flankierten. 800 µg DNA wurden mit ddH₂O auf 12 µl Volumen verdünnt und gekennzeichnet in den entsprechenden Briefkasten geworfen. Die fertigen Sequenzen konnten am folgenden Morgen heruntergeladen und mit DNASTar, FinchTV und BLAST überprüft werden.

3.2 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer Sicherheitswerkbank und möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Anzucht der Zelllinien erfolgte in Inkubatoren bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ Atmosphäre. Zu den verwendeten Zelllinien zählten Flp-In T-Rex 293 (HEK293), GripTite 293 MSR, HepG2-Tet-On, Huh-7 und CaCo-2. Die für die Zelllinien spezifischen Kulturmedien wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

Auftauen und Einfrieren

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Kryotank entnommen und sofort in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Nach Überführen der Zellsuspension in ein frisches 2 ml Röhrchen erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 300 x g, um die Zellen vom DMSO-haltigen Medium zu trennen. Das Zellpellet wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, in eine 25 cm² Zellkulturschale überführt und auf 5 ml Medium aufgefüllt. Zum Einfrieren der Zellen wurden in einem 1,6 ml Kryoröhrchen 675 µl geeignetes Zellkulturmedium und 150 µl DMSO vorgelegt. Etwa 1 Million Zellen (HEK293) bzw. etwa 2 Millionen Zellen (HepG2) wurden mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und in ein geeignetes Röhrchen zur Zentrifugation (3 min, 300 x g) überführt. Das so entstandene Pellet wurde in 675 µl Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend in das vorbereitete Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden für 24-48 h bei -80°C schonend tiefgefroren und nach dieser Zeit in den Kryotank gestellt.

Passagieren

Der Erhalt aller Zelllinien erfolgte, wenn experimentell nicht anders benötigt, in 56 cm² Zellkulturschalen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden 2 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und die Schale wurde für etwa 5 min, bis zum selbstständigen Ablösen der Zellen, in den Inkubator gestellt. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 2 ml geeignetem Medium gestoppt und die Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Alle Schritte erfolgten unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle. Je nach Zelllinie und zeitlichem Bedarf wurden die Zellen dann in unterschiedlichen Verhältnissen verdünnt und auf neue Zellkulturschalen überführt. HEK293 und CaCo-2 Zellen vermehrten sich dabei ideal nach Verdünnungen von 1:2 bis 1:10, HepG2

und Huh-7 Zellen wurden nicht stärker als 1:3 verdünnt. Die Zellkulturschalen wurden anschließend auf 10 ml Medium aufgefüllt und das Medium-Zellgemisch durch 1 bis 2-maliges auf- und abpipettieren in einer 10 ml Pipette homogen verteilt.

Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Dies ermöglicht es, natürliche und genetisch modifizierte Proteine auf ihre Funktion und Lokalisation hin im Zellkulturmodell zu vergleichen. Die Fremd-DNA wird als Teil eines Expressions-Plasmids mit vorgeschalteter Promotorsequenz in die Zellen gebracht, wo es zum Ablesen des genetischen Materials durch die Zelle und eine Translation in das entsprechende Protein kommt. Im Folgenden wird unterschieden zwischen dem kurzfristigen Verbringen von Plasmid-DNA, der transienten Transfektion und dem dauerhaften Einbringen des genetischen Materials, der stabilen Transfektion.

Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen in dieser Arbeit wurden mithilfe von Lipidmizellen durchgeführt. Plasmid-DNA wird dabei durch die Mizellierung lipophiler Substanzen in Liposomen eingeschlossen, welche die Plasmamembran der Zellen effektiv überwinden können. In den HEK293-Zellen wurde dazu Lipofectamine 2000 als Transfektionsreagenz verwendet, in HepG2- und Huh-7 Zellen hingegen X-tremeGENE 9 Transfection Reagent.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 75% auf Poly-L-Lysin (HEK293-Zellen) oder Kollagen (HepG2-Zellen) beschichteten 24-Well-Zellkulturplatten oder ibidi-slides ausgesät. Die Plasmid-DNA und das jeweilige Transfektionsreagenz wurden dann getrennt in Opti-MEM verdünnt, kurz geschüttelt und abzentrifugiert und nach 5 min gemischt. Das Gemisch wurde erneut kurz geschüttelt und abzentrifugiert und für mindestens 20 min ruhen gelassen. In dieser Zeit werden die Plasmid-DNA enthaltenden Mizellen gebildet. Nach dieser Wartezeit konnte die Transfektionsmischung in das Zellkulturmedium gegeben werden. Das Mengenverhältnis von Plasmid-DNA zu Lipofectamin war 1:2 (1 µg DNA + 2 µl Lipofectamin), bei X-tremeGene 9 war es 1:3 (1 µg DNA + 3µl X-tremeGene 9) pro Well.

Stabile Transfektion

Zur Durchführung von Transportversuchen wurde durch eine stabile Transfektion die HEK293-SLC10A5ctNTCP-Zelllinie generiert. Basis für die Transfektion ist die stabil integrierte FRT-site (*Flipase recognition target*) der Flp-In T-Rex 293 Zelllinie, welche als Ziel für die Flp-Rekombinase dient. Durch eine Kotransfektion des pcDNA5/FRT-Vektors, der ebenfalls eine FRT-site enthält, und dem pOG44-Vektor, der für die Flp-Rekombinase codiert, kommt es zu

einer homologen Rekombination am Genort der FRT-site im Genom der HEK293-Zellen. Gleichzeitig kommt die Hygromycin-Resistenzkassette des pcDNA5/FRT-Vektors zum Tragen, die eine direkte Selektion auf die integrierte DNA ermöglicht.

Die Aussaat der Zellen erfolgte in 6-Well-Zellkulturplatten bis zu einer Konfluenz von maximal 70%. Pro Well wurden 1 µg des SLC10A5ctNTCP-pcDNA5/FRT-Vektors mit 8 µg des pOG44-Vektors gemischt und mit Opti-MEM auf 50 µl aufgefüllt. Parallel wurden 24 µl Lipofectamin 2000 mit 26 µl Opti-MEM gemischt. Diese beiden Gemische wurden nach etwa 5 min zusammengeführt, kurz geschüttelt und abzentrifugiert und für 30 min ruhen gelassen. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch in das Antibiotika-freie Zellkulturmedium gegeben und über Nacht bei 37°C im Inkubator gelagert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und konnte erneut mit Antibiotika versetzt werden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und auf eine Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) überführt. Nach dem Absinken und Anwachsen der Zellen folgte noch am gleichen Tag die Zugabe von Hygromycin B als Selektionsantibiotikum in einer Konzentration von 150 µg/ml. Unter täglicher Beobachtung konnten nach 2 bis 4 Wochen mit dem bloßen Auge sichtbare Zellhaufen mit einem sterilen Tupfer von der Platte genommen und in 24-Well-Platten überführt werden. Es wurden 60 Einzelklone gesammelt. Jeder dieser Klone wurde nach Induktion über das C-terminale FLAG-tag auf seine Plasmamembranexpression überprüft und aufgrund des optischen Bildes im Wachstum und der Wachstumsrate favorisiert. Die 10 besten Klone wurden auf ihrer Genexpression hin untersucht. Der Klon mit der besten Expressionsrate wurde für alle weiteren Versuche verwendet und trägt die Kurzbezeichnung SLC10A5ctNTCP.

Transduktion

Unter dem Vorgang der Transduktion versteht man den Gentransfer durch Viren. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Zellorganellen-spezifische, GFP-gekoppelte Proteine in Zellen zu exprimieren und eine effektive Kollokalisierung mit SLC10A5 zu ermöglichen. Die Transduktion wurde einer doppelten transienten Transfektion vorgezogen, da die Zellen einer geringeren Belastung beim Gentransfer ausgesetzt waren und so eine höhere Effektivität erreicht werden konnte. Außerdem war die Transduktion so effektiv, dass eine größere Anzahl von Zellen mit beiden Proteinen gefunden werden konnte. Basis des Systems waren Baculoviren, genutzt im CellLight BacMam 2.0 System von Thermo Fisher. Die Zellorganellenmarker wurden gebrauchsfertig bestellt und in Mengen zwischen 5 und 15 µl pro cm² Wachstumsfläche eingesetzt. Baculoviren sind Insektenviren, die eine untergeordnete Gefahr für Menschen darstellen und nicht in der Lage sind sich in humanen Zellen und Zelllinien, wie sie hier verwendet wurden, zu vermehren. Nur das Einbringen des genetischen Materials durch Infektion der Zelle und Transduktion funktioniert und wird sich zu Nutze

gemacht. Dies ermöglicht einen Umgang mit diesem Virussystem unter S1 Bedingungen im Labor.

3.3 Radioaktive Transportmessungen

3.3.1 Transportmessungen in Membranvesikeln

Membranvesikel sind künstlich generierte, geschlossene kleinst-Vesikel verschiedener Membranen. Dabei wird zum einen die Plasmamembran genutzt, aber auch intrazelluläre membranumschlossene Organellen wie das Endoplasmatische Retikulum oder der Golgi-Apparat. Proteine, die in den zur Synthese verwendeten Zellen überexprimiert wurden, gelangen so auch in die Membranen der Vesikel und können auf ihre Transportaktivität hin untersucht werden. Um Membranvesikel zu erzeugen gibt es verschiedene Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurde auf die Aufreinigung von Membranen mittels Ultrazentrifugation und anschließender physikalischer Synthese von Vesikeln zurückgegriffen. Die entstehenden Membranvesikel können zwei Ausrichtungen haben, die meist im gleichen Verhältnis vorhanden sind. *Right-side-out* Vesikel haben nach ihrem Schluss eine biologisch korrekte Ausrichtung und die N- und C-Termini des überexprimierten Proteins haben ihre physiologische Orientierung. Bei *inside-out* Vesikeln ist dies genau umgekehrt. Bei Transportversuchen kommt es dann nur bei der Hälfte der Vesikel zu einer Aufnahme des Substrats. Eine Aufreinigung und Trennung der beiden Vesikelfractionen ist über eine Concanavalin-A Sepharose-Bindung möglich, bei der über eine Säule die Zuckerreste auf der Membranoberfläche von *right-side-out* Vesikeln gebunden werden, wohingegen *inside-out* Vesikel ungehindert passieren können. Meist ist auf Grund der Effektivität der Transporter bei der Synthese von Membranvesikeln aus überexprimierten Zellkulturen eine Aufreinigung nicht nötig.

Synthese von Membranvesikeln

Für die Synthese von Membranvesikeln wird möglichst viel Ausgangsmaterial benötigt, da die Verluste im Laufe des Protokolls relativ hoch sind. Sowohl stabil transfizierte SLC10A5-V5-HEK293 Zellen, als auch HEK293-FLP-In Kontrollzellen wurden gleichzeitig auf etwa 200 Millionen Zellen je Zelllinie vermehrt, aufgeteilt auf jeweils 10 175 cm² Zellkulturschalen. Die Zellen wurden 2-mal mit PBS gewaschen bevor sie in 5 ml warmem PBS pro Schale mit einem Schaber abgelöst und gesammelt in 50 ml Sarstedt-Röhrchen überführt wurden. Die leeren Schalen wurden mit 10 ml PBS, welches von Schale zu Schale überführt wurde, nachgereinigt um übriggebliebene Zellen zu gewinnen. Die Zellen wurden bei 500 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 6 ml hypotonem Puffer, welcher kurz zuvor mit Proteinase-Inhibitoren versetzt wurde, gelöst und auf Eis für 90 min leicht geschwenkt. Danach wurde die Zellsuspension in geeignete Ultrazentrifugations-

Röhrchen überführt, welche mit hypotonem Puffer aufgefüllt wurde und möglichst präzise auf einer Feinwaage austariert wurden. Die erste Ultrazentrifugation erfolgte für 40 min bei 4°C und 100.000 x *g* in einem 50Ti Rotor. Die benötigte Geschwindigkeit für die angestrebte Beschleunigung waren 33.500 rpm. Nach der Zentrifugation folgte der mechanische Aufschluss der Zellsuspension im Dounce-Homogenisator nach Potter-Elvehjem. Das bei der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 10 ml des Vesikelpuffers resuspendiert und in das entsprechende 20 ml Glasgefäß überführt. Bei einer Umdrehungszahl von 500 rpm wurden zuerst 30 Auf- und Abbewegungen mit einem Teflon-Pistill durchgeführt. Das Gefäß wurde ausgespannt und mit einem Glaspistill wurden per Hand weitere 20 Auf- und Abbewegungen durchgeführt. Alle diese Schritte wurden entweder in einer Styroporbox oder mit mit Kühlgelpackungen bei 4°C durchgeführt. Nach der Homogenisation wurde die Suspension in 15 ml Sarstedt-Röhrchen überführt und für 10 min bei 500 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Sarstedtröhrchen gegossen und der gleiche Zentrifugationsschritt wiederholt. Anschließend wurde die Suspension in Ultrazentrifugen Röhrchen überführt, präzise eingewogen und für 40 min bei 100.000 x *g* (33.500rpm) und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1-2 ml des Vesikelpuffers resuspendiert und es folgte die physikalische Formung der Vesikel aus den in der Suspension enthaltenen Membranstücken. Durch das wiederholte Durchdrücken der Membransuspension durch eine Kanüle rollen sich Membrananteile in der entstehenden turbulenten Strömung ein und schließen sich zu Vesikeln. Im ersten Schritt wurde die Suspension 5mal durch eine 22G Kanüle gedrückt, im zweiten 5mal durch eine 24G Kanüle. Die eigentliche Formung der Vesikel wurde durch 20maliges Durchdrücken durch eine 27G Kanüle erreicht. 1:10 und 1:100 Verdünnungen der Vesikelsuspension wurden photometrisch auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Dies geschah mit einem kommerziellen Bradford-Kit (Thermo Fisher Scientific) im 96-Well Format, gemessen am GloMax *Microplate Reader*. Die erhaltenen Werte wurden in GraphPad Prism übertragen und eine Extrapolation des Proteingehalts der Vesikel-Lösung vorgenommen. Anhand dieses Ergebnisses wurde die Vesikel-Lösung auf 5 mg/ml eingestellt und zu je 200 µl in Kryoröhrchen aliquotiert und im flüssigen Stick gelagert. Bei diesen Temperaturen waren die Vesikel etwa 6 Monate haltbar.

Transportmessungen in Membranvesikeln

Als Messmethode für die generierten Membranvesikel wurde Filtration durch Nitrozellulosemembranen gewählt. Die Nitrozellulosemembranen wurden im jeweiligen Vesikelpuffer in einer Petrischale für etwa 10 min vorbehandelt und anschließend in die Vakuum-Messvorrichtung eingespannt. Während der Inkubationszeit der Vesikel lief die Vakuumpumpe bereits um einen ausreichend großen Unterdruck erzeugen zu können. Für die Inkubation wurden die Membranvesikel zuerst mit dem jeweiligen radioaktiven Substrat im

Transportpuffer beladen. 20 µl der Vesikel-Lösung (entspricht 100 µg Protein) wurden in 80 µl des angesetzten Transportpuffers gegeben. Der Transportpuffer bestand aus dem Puffer, in dem die Vesikel generiert wurden, angepasst an den pH-Wert der jeweiligen Messung, nicht-radioaktives Substrat entsprechend der gewünschten Molarität und 100.000 Counts radioaktives Substrat pro Ansatz. Die Inkubationszeit der Vesikel im Transportpuffer betrug 2 min bei 37°C. Nach der Inkubationszeit wurden die gesamten 100 µl Transportlösung auf die Mitte der unter Vakuum stehenden Nitrozellulosemembran getropft. Mit dem Abstoppen der Reaktion wurde gewartet, bis die komplette Flüssigkeit der Transportlösung abgesaugt war und nur ein gelber Punkt im Zentrum der Membran zurückblieb. Das Abstoppen erfolgte mit 3 ml eiskaltem PBS, das kreisförmig um den gelben Punkt getropft wurde um die Vesikel nicht abzuspielen, sondern nur die außen zurückgebliebene Radioaktivität abzuwaschen. Anschließend wurden die Membranen zusammen mit 600 µl 1 molarer NaOH Lösung in Szintillationsröhrchen überführt und mit Szintillationsöl bedeckt. Die Radioaktivität der Proben wurde für 4 min im Flüssig-Szintillations-Counter gemessen.

3.3.2 Transportmessungen in HEK293 Zellen

Die mögliche Transportaktivität von SLC10A5 sollte mit der generierten SLC10A5ctNTCP-Chimäre über die Plasmamembran gemessen werden. Diese Messungen erfolgten mit der stabil transfizierten SLC10A5ctNTCP-HEK293 Zelllinie und einer nicht transfizierten HEK293 Zelllinie als Kontrolle. Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von etwa 30% in Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well Platten ausgesät und sowohl die stabil transfizierten Zellen, als auch die Kontrollzellen mit 1 µg/ml Tetrazyklin induziert. Nach etwa 48 h konnten die Zellen für Transportmessungen verwendet werden. Dazu wurden zuerst die Spalten der 24-Well Platten mit einem heißen Draht voneinander getrennt, um ein effektives Waschen der Zellen während der Messung zu gewährleisten. Die Kaltsubstanz des jeweiligen Transportsubstrats wurde in DMSO vorgelöst. Aus der radioaktiven Heißsubstanz und der vorgelösten Kaltsubstanz wurde dann eine konzentrierte Stocklösung hergestellt, die es ermöglichte, die gewünschte Substratkonzentration im Transportpuffer zu erreichen. Die Endkonzentration an DMSO im Transportpuffer sollte auf Grund von zytotoxischen bzw. den Transport möglicherweise beeinflussenden Effekten eine Konzentration von 0,3 % nicht übersteigen. Alle benötigten Puffer wurden auf 37°C vorgewärmt, die Zellen wurden 3-mal mit PBS (37°C) gewaschen und anschließend im Transportpuffer für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Nach der Vorinkubationszeit wurde der Puffer abgesaugt und der Transport auf einer Wärmeplatte durch Zugabe von 300 µl des entsprechenden Transportpuffers gestartet. Am Ende der gewünschten Transportzeit wurde die Aktivität der Zellen mit 5 sequenziellen Waschschritten in eiskaltem PBS gestoppt.

Bestimmung der Radioaktivität und des Proteingehalts

Nach dem Waschen der Zellen wurden sie zum vollständigen Trocknen stengelassen, mit 400 µl Lysepuffer pro Well bedeckt und bei 37°C über Nacht lysiert. 250 µl des Zellysats wurden in Minivials überführt und mit 3 ml Szintillationsöl gemischt. Die verschlossenen Minivials wurden für 5 s geschüttelt und anschließend im Flüssig-Szintillations-Counter gemessen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch die Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951). Dafür wurden dreimal 20 µl des Zellysats, zusammen mit einer Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (0-800 µg/ml) in dreifach Bestimmung, in eine 96-Well Platte überführt. 200µl Lösung C wurden in jedes Well gegeben. Nach einer Wartezeit von 15 min wurden 15 µl Folinlösung hinzugefügt und die Platte 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde bei 655 nm im ELISA-Reader gemessen. Aus den Extinktionen der Standardreihe ließ sich durch lineare Regression eine Eichgerade errechnen und die Proteinkonzentration der Proben extrapolieren. Der Gallensäuregehalt wurde auf die Gesamtproteinmenge bezogen und durch Einberechnung des Heißanteils und der Standardlösung in pmol/mg Protein angegeben.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen in der Zellkultur

Zellen für die Immunfluoreszenz wurden entweder in 24-Well-Zellkulturplatten oder ibidi-slides bis zu einer Konfluenz von 70% ausgesät. Stabil transfizierte Zellen wurden mit Tetrazyklin (10 µg/ml) induziert, die transiente Transfektion erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Nach 48 h wurden die Zellen für 5 min mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und dann mit 2% PFA für 15 min bei 4°C fixiert. Waschen mit PBS für 2 x 5 min und Puffer A für 5 min bei Raumtemperatur beendete die Fixierung. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit Puffer A + 0,2% Triton-X 100 für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Permeabilisierung wurde bei Lokalisationsversuchen von extrazellulären *tags*, wie z.B. dem N-terminale HA-*tag* in einem NTCP-Plasmid, übersprungen. Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur in Blockierlösung blockiert und mit dem primären Antikörper in Blockierlösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in völliger Dunkelheit mit dem sekundären Antikörper markiert. Es folgten erneut drei Waschschrte in PBS für jeweils 5 min bei Raumtemperatur und anschließend das Anfärben mit DAPI/Methanol (1:5000) ebenfalls für 5 min bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrte in purem Methanol wurden die Zellen getrocknet und die Deckgläschen mit *ProLong Gold Antifade* auf Objektträgern eingedeckelt.

3.4.2 Mikroskopie von lebenden Zellen

Um die dynamischen Prozesse denen Protein unterliegen darzustellen und einen Überblick über die intrazelluläre Sortierung und Lokalisation von SLC10A5 *in-vitro* zu bekommen, wurden unterschiedliche, zellorganellenspezifische Proteine zusammen mit SLC10A5 kotransfiziert und mittels Lebendzell-Mikroskopie untersucht. SLC10A5 wurde dazu an das Fluoreszenzprotein mScarlet gekoppelt. Dieses Fusionsprotein ist eine Weiterentwicklung der ersten rot fluoreszierenden Fusionsproteine wie mRFP und mCherry. Im Gegensatz zu GFP liegen diese als Monomere vor, zeigen jedoch eine wesentlich geringere Helligkeit und Quanteneffizienz. mScarlet hingegen weist eine Quanteneffizienz von bis zu 70% auf und eine stark verbesserte Helligkeit im Gegensatz zu anderen rot leuchtenden Fusionsproteinen (Bindels et al., 2017). Als Fusionsstelle wurde der C-Terminus von SLC10A5 gewählt. Zwischen die beiden Proteine wurde ein flexibles Verbindungsstück aus den Aminosäuren Glycin und Serin gesetzt mit der Anordnung: GGGGSGGGGSGGGGS. Dieses Verbindungsstück ermöglicht es den beiden fusionierten Proteinen sich mit verminderter gegenseitiger Beeinflussung freier zu bewegen (Chen et al., 2013). Das Konstrukt wurde bei der Firma BioCat (Heidelberg) komplett bestellt und im pcDNA 3.1(+) Vektor mit den flankierenden Schnittstellen für KpnI und XhoI geliefert.

Codon-Optimierung von SLC10A5

Eine weitere Besonderheit des Fusionsproteins zwischen SLC10A5 und mScarlet war die Codon-Optimierung von SLC10A5. Sowohl bei Plasmidpräparationen im Mini-Maßstab als auch bei Präparationen im Midi-Maßstab zeigte SLC10A5 wesentlich schlechtere Ausbeuten als andere, parallel präparierte Proteine. Teilweise waren die eluierten Mengen an Plasmid-DNA so niedrig, dass die für Versuche gewünschten Konzentrationen nicht zu erreichen waren oder mehrere Plasmidpräparationen gemacht werden mussten. Ein Grund dafür können bakterielle Promotorregionen auf den Plasmiden sein. Da die Vektoren schon bei der Entwicklung Codon-optimiert werden, ist die Ursache dafür auf den eingesetzten DNA-Abschnitten zu suchen. Die Vorhersage der bakteriellen Promotorregionen wurde mit dem webbasierten PePPER-Tool durchgeführt (www.genome2d.molgenrug.nl). Die Vorhersage beruhte auf einem Vergleich der hinterlegten Promotordatenbank und der Gensequenz des humanen SLC10A5. Die Auswahluntergrenze wurde bei einem Score von 7.0 festgelegt. Das Ergebnis der Vorhersage waren 3 Promotorregionen. Diese 3 Regionen wurden mit Hilfe von Codon-Verwendungstabellen für *E. coli* K12 und Homo Sapiens (www.genscript.com/tools/codon-frequency-table) überarbeitet und für jedes Codon das Basentriplet mit der höchsten Frequenz gewählt, sodass die Promotorvorhersage kein Ergebnis über einem Score von 4,0 lieferte. Die Codon-optimierte SLC10A5 Nukleotidsequenz

wurde bei der Firma BioCat (Heidelberg) im pcDNA 3.1(+) Vektor mit den beiden flankierenden Restriktionsschnittstellen für KpnI und XhoI bestellt.

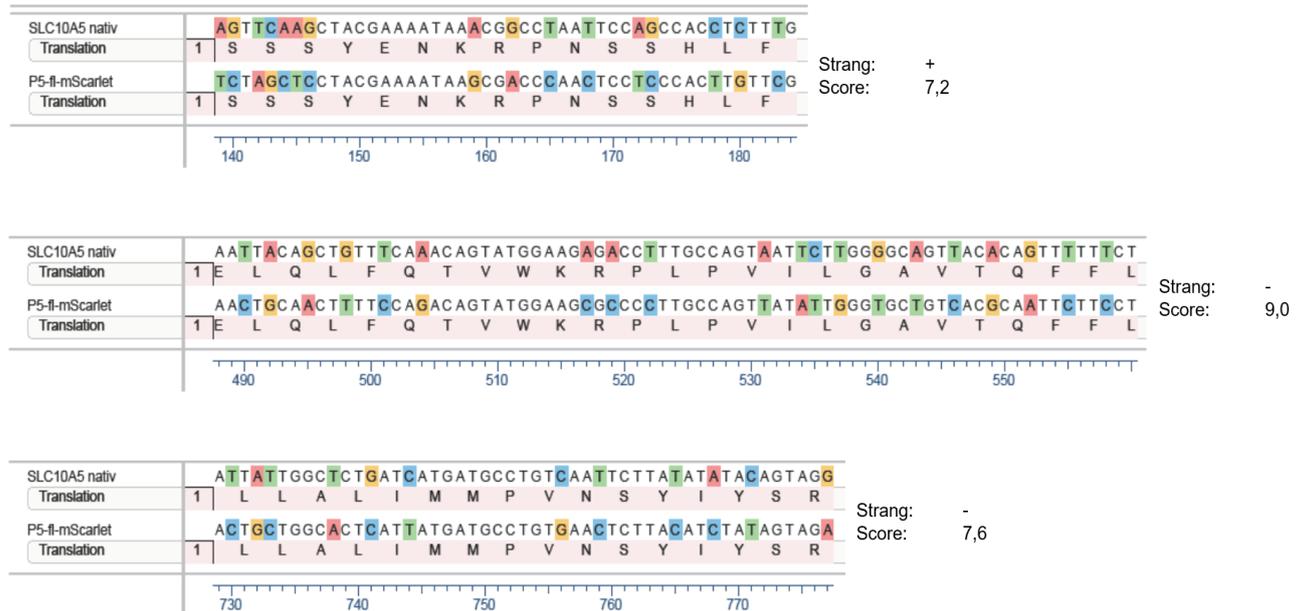


Abbildung 3-1: Schema der bei der Codonoptimierung veränderten Bereiche von SLC10A5.

Die veränderten Nukleotide sind bunt dargestellt. Zur Kontrolle die Übereinstimmung des nativen SLC10A5 und des Codon-optimierten SLC10A5 auf Proteinebene, hier dargestellt unterhalb der jeweiligen Nukleotidsequenz. Die Scores aller optimierten Bereiche lagen bei erneuter Überprüfung unterhalb von 4,0.

Kolokalisation in lebenden Zellen

Um bestimmte Zellorganellen zur Kolokalisation mit SLC10A5 anzufärben, wurden organellenspezifische an GFP fusionierte Proteine in einem Baculovirus-Expressionssystem gewählt. Baculoviren sind doppelsträngige Insektenviren, die in Säugetierzellen nicht replikationsfähig sind. Das System verwendet den BacMam pCMV-Dest Vector, der ein modifiziertes Baculovirus codiert, welches das gewünschte Genmaterial mit hoher Transduktionseffizienz in die Zellen einbringt. Die CellLight BacMam 2.0 Organellenmarker wurden in gebrauchsfertiger Lösung von Thermo Fisher Scientific bezogen. Die untersuchten Organellen waren Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Peroxisomen, frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen.

Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von 30% auf 8 Well Ibidi μ -Slides in 200 μ l Medium ausgesät und nach einer Wartezeit von 10 min mit SLC10A5mScarlet transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Organellenmarker direkt zu den transfizierten Zellen gegeben. Die benötigte Menge an Baculovirus-Lösung wurde für die einzelnen Marker angepasst und

betrug: 8µl ER-Marker, 8µl Golgi-Marker, 6µl Peroxisomen-Marker, 10µl Marker für frühe Endosomen, 9µl Marker für späte Endosomen und 7µl Lysosomen-Marker. Nach 24 Stunden wurden die Zellkerne für 15 min mit 1 µg/ml Hoechst33342 direkt im Medium gefärbt. Anschließend wurde das Medium abgezogen und 150 µl PBS zur Betrachtung unter dem Mikroskop auf die Zellen gegeben.

3.4.3 Gewebelokalisation von SLC10A5

Die Lokalisation des nativen SLC10A5 Proteins im Gewebe ist essentiell für eine stichfeste Aussage über das Zielorganell des Proteins. Kommerziell erhältliche Antikörper gegen verschiedene Epitope von SLC10A5 zeigten bislang keine spezifische Färbung des Proteins im Gewebe. Deshalb wurde am Institut für Veterinärpharmakologie und Toxikologie in Gießen ein selbstgenerierter Antikörper von Dr. Gary Grosser in Auftrag gegeben (Eurogentec). Die Herstellung des polyklonalen Antikörpers dauerte ca. 3 Monate und wurde im Double X Protocol durchgeführt. Dazu wurden 2 Kaninchen jeweils mit einer Mischung aus zwei Peptiden immunisiert, die aufgrund ihrer Lage und bioinformatischer Faktoren ausgewählt wurden (Abbildung 3-2). Die Immunisierung der Tiere erfolgte an Tag 0, 14, 28 und 56. Die Qualität der Immunantwort und damit verbundene potentielle Qualität der gewonnenen Antikörper wurde mittels ELISA an Tag 0, 38, 66 und aus der finalen Blutentnahme an Tag 87 überprüft. Gegen das C-terminal gelegene Epitop zeigte sich dabei eine stärkere Immunantwort. Die Antikörper wurden abschließend einer Affinitäts-Aufreinigung unterzogen und geliefert. Der erste Antikörper (GCKIEFQVLQTVWKR) bekam die Bezeichnung AB7648, der gegen das C-terminal gelegene Epitop gerichtete Antikörper (AKRRPSLSTEYEKTPLV) die Bezeichnung AB7649 .

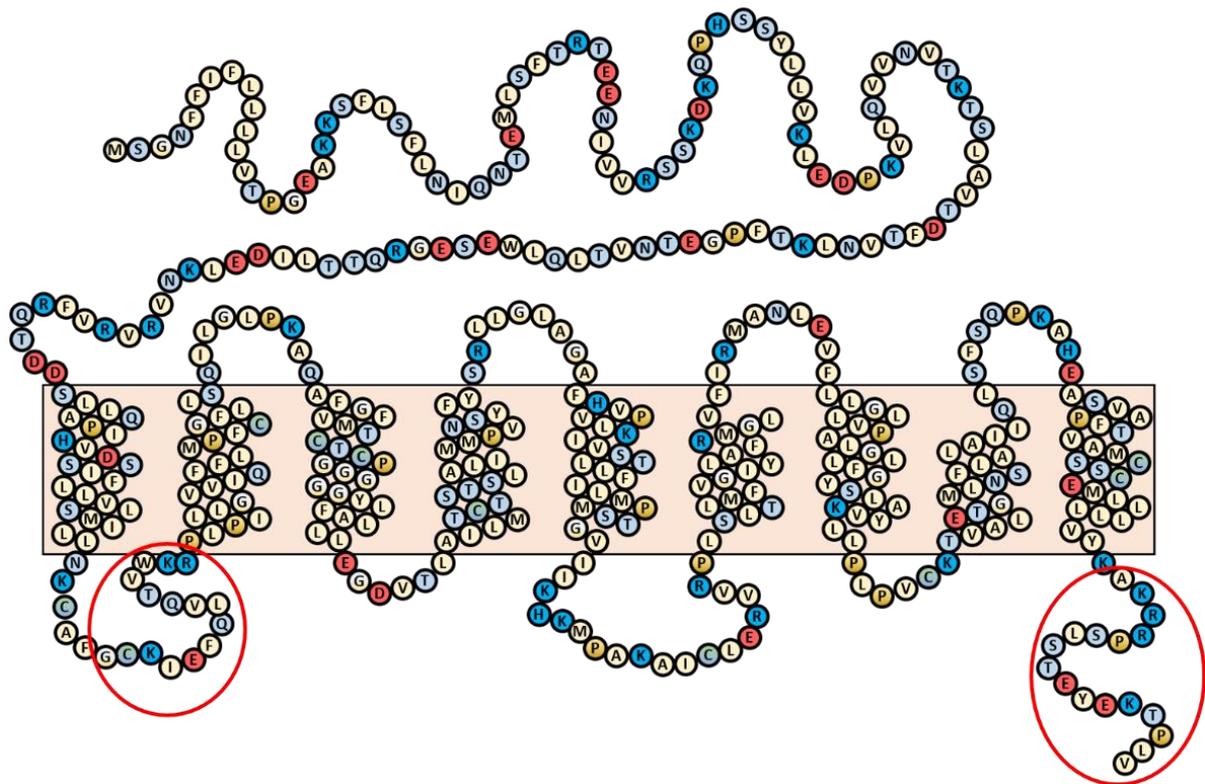


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der für die Generierung der Antikörper gewählten Bereiche des SLC10A5-Proteins

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des murinen SLC10A5-Proteins. Das erste Epitop befindet sich zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (GCKIEFQVLQTVWKR), das zweite am C-terminalen Ende des Proteins (AKRRPSLSTEYEKTPLV)

Perfusionsfixierung

Bei der antikörperbasierten Fluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten spielt die Art der Fixation eine entscheidende Rolle. Nicht-fixiertes Gewebe hat eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als fixiertes Gewebe und Feinstrukturen werden geschädigt. Bei zu starker Fixation kommt es zu einer kompletten Maskierung der Epitope und Antikörper können das Zielprotein nicht mehr detektieren. Vorversuche mit nativem, auf Objektträgern fixiertem, Gewebe zeigten, dass die Organstrukturen bei den Wasch- und Färbeprozessen schwer bis komplett zerstört wurden. Die Organschnitte nach transkardialer Perfusion mit Paraformaldehyd blieben jedoch in ihrer Struktur erhalten, weshalb diese Methode zum Aufbereiten der Mausorgane für die Immunfluoreszenz gewählt wurde.

Die C57B6/N und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse wurden dazu mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde mit dem Lidreflex, dem Cornealreflex, dem Zwischenzehenreflex und der Pupillen-Licht-Reaktion überprüft. Waren alle diese Reaktionen negativ, wurde zuerst der Bauchraum, dann der Brustraum von kaudal eröffnet. In die linke Kammer des Herzens wurde eine 24 G Kanüle

eingeführt und das rechte Herzohr wurde mit einer Schere zur Druckentlastung eröffnet. Über die Kanüle wurden zuerst ca. 25 ml eiskalte, isotonische Kochsalzlösung mit einem Druck von etwa 88 mmHg (110 cm Wassersäule) in den Körperkreislauf laufen gelassen, bis die austretende Flüssigkeit am rechten Herzohr sichtbar klar wurde. Danach wurden ca. 45 ml eiskalte, 4%ige Paraformaldehyd-Lösung zur Fixierung über die Kanüle in die linke Herzkammer geleitet. Das Steifwerden der Gliedmaßen, des Schwanzes und die gummiartige Veränderung der Leber dienten als Anhaltspunkte für den Abschluss der Perfusion. Leber, Nieren, Darmabschnitte und Herz wurden anschließend entnommen, in ca. 1 cm große Stücke geschnitten und bei 4°C für weitere 2 h in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung gelagert. Anschließend wurden die Organe einmal mit PBS gewaschen und danach stündlich in einer steigenden Saccharose-Reihe einer Kryoprotektion unterzogen. Die Konzentrationen der phosphatgepufferten Saccharose-Lösungen lagen bei 10%, 20% und 30%. Die Gewebeproben wurden über Nacht bei 4°C in 30%ige Saccharose-Lösung gelegt. Nach etwa 16 h folgte die Einbettung der Gewebestücke in Einbettenschälchen mit Tissue-Tek. Dazu wurde das Gewebestück mit einem Tropfen Tissue-Tek an den Boden des Einbettenschälchens angeheftet und anschließend bis zum Rand bedeckt. Luftblasen wurden mit Kanülen aus dem noch flüssigen Tissue-Tek entfernt. Das Durchfrieren der Proben erfolgte auf Trockeneis. Die so erhaltenen Gewebelöcke wurden bei -20°C und in Alu-Folie eingewickelt gelagert.

Schneiden der Gewebepreparate am Kryotom

Das Schneiden der eingebetteten Organe erfolgte an einem Leica Kryostat (Leica Biosystems). Die gefrorenen Blöcke wurden mit einem Tissue-Tek Tropfen an ein Filterpapier geklebt und mit einem Tropfen Wasser an der Filterseite mit dem Gewebelöckhalter bei -20°C verbunden. Die Innenraumtemperatur des Kryostats lag bei -20°C, die des Blockhalters bei -22°C. Die Oberfläche des Gewebelöcks wurde in 20 µm Schritten angeschnitten bis alle Unebenheiten komplett ausgeglichen waren und ein Schnitt den kompletten Block beinhaltete. Die Schnittdicke wurde dann auf 10 µm verringert und die Gewebeschnitte wurden auf Adhäsionsobjektträgern, welche Raumtemperatur hatten, durch Berührung aufgezogen. Es wurden jeweils zwei Gewebeschnitte auf einem Objektträger nebeneinander platziert. Die Objektträger wurden in passenden Boxen bei -20°C gelagert. In die Box wurde ein zusätzliches nasses Papiertuch gelegt um einen besseren Schutz gegen Austrocknung zu gewährleisten.

Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Die Fluoreszenzfärbung mit Hilfe von Antikörpern basiert auf einer Kombination von 2 unterschiedlichen Antikörpern. Der primäre Antikörper ist spezifisch gegen ein Epitop des anzufärbenden Proteins gerichtet, der sekundäre Antikörper ist fluoreszierend und gegen die Tierart gerichtet, in der der erste Antikörper generiert wurde. Das Zusammenspiel der beiden Antikörper spiegelt sich dann in einer spezifischen, fluoreszenzbasierten Färbung des Zielproteins wider.

Das Protokoll zur Fluoreszenzfärbung der Gewebeschnitte durch Antikörper begann mit einer 25-minütigen Auftauphase, in der sowohl das Gewebe als auch die Objektträger Raumtemperatur erreichen konnten. Danach wurde das Gewebe 3-mal für 5 min in PBS rehydriert. Anschließend wurde die Fläche auf den Objektträgern um die Gewebeschnitte herum vorsichtig getrocknet und ein Kreis mit einem Dako Pen (Sigma) um das Gewebe gezogen. Dieser erzeugt eine wasserabweisende Barriere, die es ermöglicht die Schnitte auf dem Objektträger separat mit Flüssigkeiten zu inkubieren. Nach kurzer Trocknungszeit wurden die Gewebeschnitte für 5 min mit 0,1% SDS in PBS zur Antigendemaskierung inkubiert und anschließend 3-mal für 10 min in PBS gewaschen. Um endogene Bindungsstellen des sekundären Antikörpers zu sättigen und eine spezifische Färbung des primären Antikörpers zu erreichen, wurden die Gewebeschnitte im Folgenden für 30 min mit Blockierpuffer inkubiert. Die Konzentration des Serums der Wirtstierart des sekundären Antikörpers wurde dabei 1:10 in PBS verdünnt eingesetzt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei 4°C mit Inkubationspuffer bedeckt, welcher den Primärantikörper in passender Verdünnung enthielt. Zusätzlich zum Antikörper waren dem PBS 1% des Blockierserums und 0,1% Triton X-100 zugesetzt. Nach etwa 20 h wurde der Inkubationspuffer 3-mal für 5 min mit PBS von den Objektträgern heruntergewaschen und es folgte für 90 min die Färbung mit dem sekundären Antikörper im Inkubationspuffer in einer dunklen Box bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger 3-mal für 5 min in PBS gewaschen und vorsichtig mit einem Papiertuch getrocknet. Die Färbung der Kernstrukturen erfolgte in Kombination mit dem Einbettmedium. 20µl Vectashield *Antifade Mounting Medium with DAPI* wurden auf jeden Schnitt gegeben und mit 24x50 mm Deckgläschen unter leichtem Druck aufgebracht, bis das Einbettmedium gleichmäßig verteilt war. Die Kanten des Deckgläschens wurden mit nicht fluoreszierendem, klarem Nagellack (*essence top-sealer*) versiegelt, um eine längere Haltbarkeit der Gewebeschnitte zu gewährleisten. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4°C und Dunkelheit.

Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die histologische Färbung von Organschnitten der Mäuse erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Daniela Fietz am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Das in Bouin-Lösung fixierte und mehrfach mit 70%igem Ethanol gewaschene Mäusgewebe wurde dort in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 6 µm dicke Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Auswertung und Aufnahme von Bildmaterial erfolgte am Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit dem Mikroskop Leica DM 5500 B, der Leica LAS Software und der Farbkamera DFC320.

3.5 In-vivo Versuche

3.5.1 Die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus wurde von TIGM (Texas A&M Institute for Genomic Medicine) generiert. Der Gen Knockout wurde mittels einer LacZ/Neomycinresistenzkassette erzielt, die anstelle des codierenden Exons durch *Gene targeting* mittels homologer Rekombination in das Genom eingesetzt wurde. Durch diesen Austausch wurde der für das Protein codierende Bereich des *Slc10a5*-Gens vollständig entfernt und es kann kein SLC10A5-Protein mehr gebildet werden. Mit dem Import von zwei heterozygoten B6x129S5 (C57BL/6Nx129SvEvBrd) Zuchtpärchen von TIGM wurde dann die Rückkreuzung auf den C57BL/6N Hintergrund begonnen.

3.5.2 Speed Congenics gestützte Rückkreuzung

Die konventionelle Zucht kongener Stämme erfolgt durch die Rückkreuzung des interessierenden Allels vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm, um einen Inzuchtstamm zu generieren, der sich nur an einem genetischen Locus unterscheidet. Dazu werden rein rechnerisch 10 Rückkreuzungen angestrebt, von der Filialgeneration F1 über die Rückkreuzungsgenerationen N2-N10. Bei der Effektivität der Rückkreuzung sind dabei die Genomanteile ohne Kopplung zum selektierten Genort, also die Chromosomen ohne Gen-Knockout und die Genomanteile, die eine Kopplung über das gleiche Chromosom aufweisen, zu unterscheiden. Genomanteile ohne Kopplung verlieren bei jeder Rückkreuzung theoretisch 50% des Donorstammanteils, was für die 10. Generation einen Wert von 0,1% Restanteil des Donorstamms bedeutet. Wesentlich schwerwiegender sind Donorstammanteile die mit dem selektierten Genort gekoppelt sind. Diese können nur durch Crossing-over während der Meiose ausgetauscht werden.

Um den Rückkreuzungsprozess bei der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus zu beschleunigen, wurde auf ein *Speed Congenics* gestütztes Programm zurückgegriffen. Männliche Nachkommen der

Rückkreuzungen werden über 1449 SNPs auf ihren Verwandtschaftsgrad zum Rezipientenstamm untersucht, um jene Tiere zur weiteren Zucht auszuwählen, die die geringsten Donorstammanteile haben. In späten Rückkreuzungsrunden spielen vor allem die Polymorphismen eine Rolle, die an den selektierten Genort gekoppelt sind, da die nicht-gekoppelten Regionen meist schon komplett dem Rezipientenstamm entsprechen.

Für die Rückkreuzung der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus auf ihren C57BL/6N Hintergrund wurde fünfmal das *Speed Congenics* Programm von Taconic verwendet, die letzten beiden Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit. Schwanzspitzenbiopsien der Mäuse wurden in 70% Ethanol in 1,5 ml Gefäßen versendet und die Ergebnisse der 1449 Marker SNP Analyse wurden per Exceltabelle übermittelt.

3.5.3 Analyse nicht rekombinierter Genombereiche

Der Phänotyp einer transgenen Maus, wie in diesem Fall der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus, kann durch Restanteile des Donorstamms, die durch die Nähe zum selektierten Genort während der Meiose nicht rekombiniert wurden, erheblich beeinflusst werden (Lusis et al., 2007). Um einen möglichen Einfluss von gekoppelten Genen des Donorstamms auszuschließen, wurden alle Gene im Bereich zwischen dem Anfang von Chromosom 3 und dem stromabwärts liegenden SNP rs3715834 der Speed Congenics Analyse betrachtet (Abbildung 3-3). Dies ist der Bereich, welcher nicht eindeutig dem Rezipientenstamm (C57BL/6N) zugeordnet werden kann. Um eine komplette Liste der Gene in diesem Bereich zu finden, wurde der *Genome Data Viewer* des NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>) verwendet. Pseudogene, vorhergesagte Gene und Gene, zu denen es keinerlei Informationen gibt wurden dabei außer Acht gelassen.

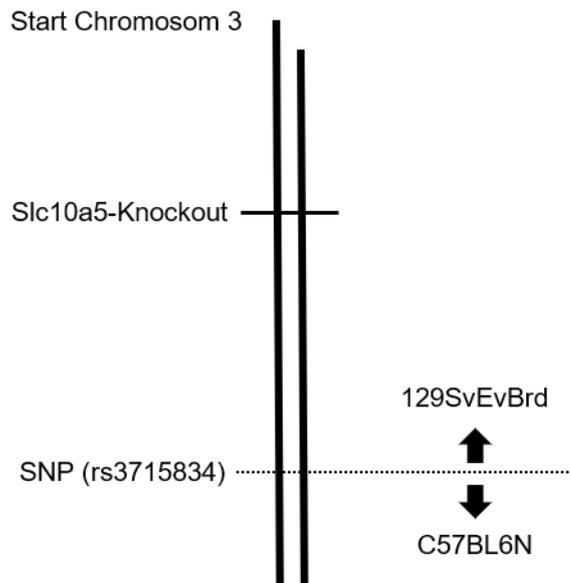


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des an den *Slc10a5*-Knockout gekoppelten Bereichs auf Chromosom 3 der Maus

Stromaufwärts des *Slc10a5*-Gens auf Chromosom 3 befindet sich kein SNP, der eine Unterscheidung zwischen den Mauslinien 129SvEvBrd und C57BL6N erlaubt. Der erste SNP, der Stromabwärts eine Zuweisung zur C57BL/6N-Linie zeigt, ist rs3715834 an Position 26405124 des Chromosoms.

3.5.4 Genotypisierung der Knockout-Maus-Linien

Die Genotypisierung der Knockout-Maus-Linien erfolgte über DNA, die aus Ohrstanzen gewonnen wurde. Hierzu wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) verwendet. Bei diesem säulen-basierten Kit wird das Gewebe zuerst durch die Proteinase K lysiert und die freiwerdenden Nukleinsäuren werden an die Säulenmatrix gebunden. Nach zwei Waschschrritten wird die aufgereinigte genomische DNA durch einen Elutionspuffer von der Matrix gelöst und kann in der PCR eingesetzt werden. Die einzige Abweichung vom *QIAamp Spin procedure* Protokoll stellte die Elution in 80 µl Puffer, statt wie angegeben 200 µl, dar.

Für den im weiteren Verlauf beschriebenen Versuch wurde die Gruppe der C57BL/6N Wildtyp-Mäuse aus Gründen der Tierzahlreduktion aus den Wildtyp Tieren der *Slc10a4^{-/-}* Linie gezüchtet. Um Verwechslungen auszuschließen, wurden alle Tiere sowohl auf ihren *Slc10a5* als auch auf ihren *Slc10a4* Status genotypisiert.

Genotypisierungs-PCR auf *Slc10a5*

Die PCR setzt sich aus 2 getrennten Reaktionsansätzen zusammen. Das Wildtyp-Allel wurde mit den Primern mp5-180bp-f und mp5-180bp-r nachgewiesen, die ein 180 bp langes DNA-Fragment amplifizieren. Der Nachweis des Knockout-Allels erfolgte über die Primer mp5-PCR-m-Neo3a-f und mP5-PCR-m-L-r, welche zur Amplifikation eines 362 bp großen Amplifikats führen.

Für den folgenden 20 µl Reaktionsansatz wurde die *Phusion Flash II HiFi* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) im vorgeschmischtem Mastermix verwendet. Dieser enthält bereits den Reaktionspuffer, dNTPs und MgCl₂.

- 10 µl Phusion Flash HIFI Mastermixspeed
- 1 µl Vorwärtsprimer
- 1 µl Rückwärtsprimer
- 7 µl dd H₂O
- 1 µl DNA Template

Die PCR wurde als *Touchdown-PCR* wie folgt durchgeführt:

Initiale Denaturierung	2 s	98°C	
Denaturierung	1 s	98°C	} 10x
Primer Anlagerung	5 s	72°C (-0,2°C/Zyklus)	
Elongation	5 s	72°C	
Denaturierung	1 s	98°C	
Primer-Anlagerung	5 s	64°C	
Elongation	5 s	72°C	
Finale Elongation	1 min	72°C	
Lagerung	∞	4°C	

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1,5% Agarosegel bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA aufgetrennt.

3.5.5 Die Stoffwechselbilanz der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Erheben von Futter- und Gewichtsdaten

Mit dem Absetzen der Mäuse in der 4. Lebenswoche wurden je 2 Tiere des gleichen Geschlechts und des gleichen Genotyps zusammen in einen neuen Käfig gesetzt. Für die Dauer von 6 Monaten bis zur finalen Entnahme der Proben wurden die Mäuse jeden Montag zwischen 9 und 11 Uhr während des Umsetzens in einen neuen Käfig gewogen. Dabei wurde ein Becher verwendet, aus dem die Mäuse nicht von alleine herausklettern konnten, um die

Tiere sicher zu wiegen. Zusätzlich wurde das im Käfig verbliebene Futter sowie die Menge an aufgefülltem Futter gewogen, um die Futterraufnahme pro Woche pro Käfig berechnen zu können. Größere Futterstücke, die durch die Raufe gefallen waren, wurden per Hand aus dem Käfig gesammelt und zum Wiegen dem Rest hinzugefügt.

Sammeln des Mäusekots

Um Futterraufnahme und Kotabsatz vollständig bilanzieren zu können musste der komplette Kot eines Käfigs von Einstreu und Zellstoff getrennt werden. Einmal pro Monat wurde der Kot einer Woche jeweils zwischen zwei Futtereinwaagen gesammelt. So wurde die 6., 10., 14., 18., und 22. Lebenswoche der Tiere dargestellt. Der Inhalt des Käfigs wurde großflächig ausgebreitet und der Kot mit einer Pinzette herausgesammelt. Zusätzlich wurden 4 zufällige Käfige für einen Sammelzeitpunkt mit Zellstoffstreu statt Holzspänen ausgestattet. Diese normalerweise postoperativ verwendete Einstreu ist wesentlich gröber und weiß. Nach der Trennung vom Mäusekot wurde die Einstreu 48 Stunden lang unter dem Abzug ausgebreitet und getrocknet. Anschließend wurden auf einem feinen Gitterrost alle anhaftenden Partikel von der Einstreu heruntergerieben und aufgefangen. Beim übriggebliebenen, feinkörnigen Staub handelte es sich zu einem großen Teil um durch Nagen der Mäuse entstandenen Futterabrieb. Dieser wurde rückgewogen und der Mittelwert der 4 Käfige repräsentativ als Fehlerwert bei der Berechnung der wöchentlichen Futterraufnahme einbezogen. Die Lagerung der Kotproben erfolgte bei -80°C . Zusätzlich zu den Kotproben wurde zu jedem Sammelzeitpunkt eine Probe des Futters genommen. Diese Futterproben wurden nicht gefriergetrocknet, sondern sofort gemahlen und in der Kalorimetrie gemessen.

Vorbereitung der Proben für die Kalorimetrie

Gefriertrocknung

Bei der Gefriertrocknung wird der Wassergehalt der Proben auf unter 4% gesenkt. Der Vorteil gegenüber hitzebasierten Trocknungsverfahren ist die schonendere Behandlung des Trocknungsguts. Basierend auf dem Prinzip der Sublimation wird dem Kot bei Unterdruck die Feuchtigkeit entzogen. Die Proben werden in Aluminiumgefäße überführt und auf beheizbare bzw. kühlbare Platten in den Gefriertrockner gestellt. Initial werden die Proben bei Normaldruck auf -20°C tiefgefroren. Danach wird das Verfahren in zwei Abschnitte unterteilt.

Bei der Primärtrocknung wird in der Probenkammer ein Vakuum angelegt. Das Wasser fällt so unter den Tripel-Punkt und hat einen ausreichend hohen Dampfdruck, um von der festen Phase direkt in die gasförmige Phase überzugehen. Der so entstandene Wasserdampf wird in einer Parallelkammer kondensiert. Die Menge an Energie, die den Proben als Sublimationsenergie verloren geht, führt zu einer weiteren Temperatursenkung der Proben

und wird über die Heizplatten in gleichem Maße kompensiert. Anschließend folgt die Sekundärtrocknung. Durch Erwärmen der Proben auf bis zu 5°C wird stärker gebundenes Wasser entfernt. Das Gefriertrocknungsprotokoll am hier verwendeten Gerät dauerte etwa 40 Stunden.

Mahlen und Pelletieren der Proben

Die Proben wurden in einer Zentrifugalmühle gemahlen. Dazu wurden sie in die Mitte des laufenden Rotors geschüttet, durch die Zentrifugalkraft nach außen an das Mahlsieb geschleudert und durch die rotierenden Klingen pulverisiert. Nach jeder Probe wurden die Klingen, das Sieb und der Auffangbehälter komplett mit dem Pinsel trocken gereinigt. Das entstandene Pulver wurde ebenfalls bei -80°C gelagert. Die Futterproben wurden ohne vorherige Trocknung pulverisiert. Damit eine rückstandslose Verbrennung bei der Bombenkalorimetrie gewährleistet werden konnte mussten die Proben zu Pellets gepresst werden. Etwa ein Gramm Kotpulver wurde pro Probe gepresst und im Kalorimeter gemessen. Die maximale Masse der Probe wurde so gewählt, dass deren Energie niedriger liegt als die Energie der zum Eichprozess verwendeten Benzoessäuretablette.

Bombenkalorimetrische Messung

Die isoperibole Bestimmung des Brennwertes einer Probe durch Bombenkalorimetrie beruht auf einer Messung der Temperaturveränderung von Wasser, welche durch das Verbrennen des Probenmaterials in reinem Sauerstoff und unter Druck ausgelöst wird. Das Bombenkalorimeter besteht aus einer wassergefüllten Kammer mit Temperaturfühlern und einem Rührgerät, die von einem temperaturkonstanten (isoperibolen) Wassermantel umgeben ist. In die wassergefüllte Kammer wird dann die Messbombe gestellt. Die Bombe wird mit 5ml Wasser befüllt und die zu messende Probe in einen am Deckel befestigten Tiegel gelegt. An das Zündelement wird ein Baumwollfaden mit definiertem Brennwert von 50 Joule gebunden, auf dessen anderem Ende die Probe im Tiegel liegt. Das gewährleistet eine sichere Zündung des Probenmaterials. Die Bombe wird vor der Messung mit reinem Sauerstoff bis zu einem Druck von 30 Bar gefüllt. Dieser Überschuss an Sauerstoff wird für eine rasche und vollständige Verbrennung der Probe benötigt. Zur Eichung der verwendeten Bomben wurden je drei Messungen mit Benzoessäuretabletten, die einen definierten Brennwert aufwiesen, durchgeführt. Aus diesen Eichmessungen ergab sich die Kalorimeterkonstante C_{kal} , die für jede Bombe spezifisch ist. Die Messung der Kot- und Futterproben unterteilte sich in drei Phasen. Während des Einschwingens wurde die Temperatur des äußeren Mantels der Temperatur des Wassers in der Kammer weitestgehend angeglichen. Dieser Vorgang dauerte zwischen 6 und 9 min. In der zweiten Phase folgte die Zündung der Bombe. Während dieses Hauptversuches, der etwa 10 min dauerte, wurde der Anstieg der Temperaturdifferenz zwischen Mantel und Wasserbecken gemessen. Verringerte sich die Geschwindigkeit dieses

Temperaturanstieges begann der Nachversuch. Diese dritte Phase wurde beendet sobald sich eine Verringerung der Temperaturdifferenz abzeichnete. Insgesamt dauerten die Messungen im hier durchgeführten Versuch im Mittel 27 min.

Das Bombenkalorimeter berechnete den Brennwert der Proben automatisch und mit folgender Formel:

$$Q_v (Probe) = \frac{C_{kal} \cdot \Delta T_{korrr}}{m} - Q_v (Faden)$$

$Q_v (Probe)$ = Brennwert der gemessenen Probe in $\left[\frac{J}{g}\right]$

C_{kal} = Kalorimeterkonstante, $\left[\frac{J}{K}\right]$

ΔT_{korrr} = gemessene Temperaturdifferenz abzüglich der Temperaturdifferenz zwischen Mantel und Wasserkammer am Ende der Einschwingphase, [K]

m = Gewicht des Probenpellets, [g]

$Q_v (Probe)$ = Brennwert des Zündfadens (50 Joule), [J]

Finale Probenentnahme

In der 26. Lebenswoche der in diesem Versuch beobachteten *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäuse und C57BL6/N Mäuse wurden alle benötigten Proben postmortal entnommen. Dazu zählten systemisches Blut, Portalblut, Galle, Kot aus dem Enddarm und Organproben für histologische Schnitte und die Extraktion von RNA. Das Töten der Mäuse erfolgte durch cervikale Dislokation und wurde durch Ertasten der kompletten Trennung der Wirbelsäure im Halsbereich bestätigt. Nach dem Eintreten des Todes wurden schnellstmöglich 100 - 150 µl Blut retrobulbär mit einer Glaskapillare entnommen. War es durch die cervikale Dislokation nicht möglich, genügend Blut mit der Kapillare zu gewinnen, wurde mit einer 22G Kanüle auf einer 1 ml Spritze eine Punktion des Herzens durch den geschlossenen Brustkorb durchgeführt und die benötigte restliche Menge gewonnen. Anschließend wurde die Maus mit Klebebandstreifen auf dem Rücken fixiert und die Bauchhöhle wurde von caudal mit einer Schere bis zum Sternum eröffnet. Zu beiden Flanken hin wurden Entlastungsschnitte nach dorsal gemacht, die Bauchhöhle freigelegt und das Darmkonvolut sowie die Leber zur Seite geschoben, bis die Pfortader sichtbar wurde. Die Pfortader wurde von caudal mit einer 27G Kanüle auf einer 1 ml Spritze punktiert und es wurden etwa 100 µl Portalblut gewonnen. Die Leber wurde zurückverlagert, die Gallenblase durch Anheben einiger Leberlappen freigelegt und der Ductus choledochus kurz vor dem Lebereintritt mit einer Klemme ligiert. Die Gallenblase wurde mit einer Pinzette an der Spitze fixiert und mit einer 50 µl Hamilton Spritze mit 27G Kanüle punktiert. Es wurde die gesamte Gallenmenge entnommen und sofort auf Eis gestellt. Es folgte

die Entnahme der Organe in der Reihenfolge angefangen bei der Leber über die Nieren bis zum kompletten Darmkonvolut. Der Darm wurde in 5 Abschnitte unterteilt, die zumindest im Ansatz die 5 Darmabschnitte der Maus repräsentieren sollen. Der erste Abschnitt, das Duodenum, wurde anhand des relativ kurzen Gekröses identifiziert und am Übergang zum langen Gekröse des Jejunums abgetrennt. Das Jejunum wurde am kürzer werdenden Teil des Gekröses, etwa 3 - 4 cm vor dem Übergang zu Caecum und Colon abgesetzt. Das Ileum wurde an eben diesem Übergang in die Dickdarmbereiche getrennt. Das Colon geht aus der kranialen Seite des Caecumkopfes hervor und wurde an dieser Stelle abgesetzt. Das Colon wurde so weit wie möglich kaudal im Beckenbereich abgetrennt und der Länge nach aufgeschnitten um Kot zu entnehmen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu überführen um diese für die Analyse, wie im nächsten Kapitel beschrieben, aufzubereiten. Die fünf Darmabschnitte wurden mit 4°C kalter Kochsalzlösung durch eine 12G Kanüle mit einer 10 ml Spritze gespült, bis alle sichtbaren Kotpartikel ausgespült waren. Alle entnommenen Organe wurden halbiert und aufgeteilt auf 1,5ml Reaktionsgefäße, gefüllt mit 2 unterschiedlichen Lösungen. Zum einen wurden die Organproben, für die Extraktion von totaler RNA, mit 750 µl RNAlater (Qiagen) bedeckt und bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung gelagert. Die andere Hälfte der Organe wurde in 1000 µl Bouin-Lösung (zur Verfügung gestellt vom Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie) gelegt und bei 4°C gelagert, bis die Weiterverarbeitung zu Paraffinschnitten für die histologische Betrachtung folgte. Die systemischen Blutproben und Portalblutproben wurden nach der Entnahme für 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen um eine ausreichende Gerinnung zu erreichen. Zur Gewinnung von Serum wurden die Proben anschließend bei 2000 x g für 15 min zentrifugiert, der flüssige Überstand wurde mit einer Pipette entnommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Alle Serumproben sowie die Gallenproben und die aus dem Enddarm entnommenen Kotproben wurden bis zum Versand bei -80°C aufbewahrt.

Aufbereitung der Kotproben

Die aus dem Colon entnommenen Kotproben wurden anhand eines von Herrn Dr. Herebian zur Verfügung gestellten Protokolls mit kleinen Modifikationen bei der Homogenisierung der Proben für die massenspektrometrische Messung der Gallensäuren aufbereitet. 50-100 mg des entnommenen Kots wurden in ein Fast-Prep Lysing Matrix D Röhrchen überführt und mit 1 ml Ethanol-puffer, bestehend aus einem Volumenverhältnis von 80 % Ethanol und 20% PBS, bedeckt. Die Homogenisierung erfolgte im Fast-Prep 24 Homogenizer mit dem Standardprogramm für die gewählten Röhrchen zur Homogenisierung von Kot (30s, 4,0 M/S). Die Proben wurden anschließend für 30 min in einem Thermomixer bei 55°C bei 300 rpm geschüttelt. Danach wurden die Proben auf Eis heruntergekühlt und für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden nach dem Zentrifugieren in neue 2 ml Reaktionsgefäße

durch Schütten überführt. Mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators wurden die Proben für etwa 6 Stunden bei 500 x g aufkonzentriert. Die verdunstende Flüssigkeit wird dabei über eine Kältefalle kondensiert um bei gleichzeitiger langsamer Zentrifugation der Proben eine Aufkonzentrierung aller festen Bestandteile zu gewährleisten. Dieser Vorgang wurde so lange durchgeführt, bis die Reaktionsgefäße augenscheinlich trocken waren und sich ein gelbbrauner Belag am Boden der Gefäße abzeichnete. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C und der Transport nach Düsseldorf in das Stoffwechsellabor von Herrn Dr. Herebian auf Trockeneis.

Massenspektrometrische Analyse der Gallensäuren

Die Gallensäureanalytik wurde im Stoffwechsellabor des Universitätsklinikums Düsseldorf von Herrn Dr. Herebian und Mitarbeitern durchgeführt. Die Gallensäuren wurden mittels UHPLC-MS/MS (*Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) gemessen. Genutzt wurde ein UPLC I-Class System (Waters, UK) zusammen mit einem Xevo TQ-S *triple quadrupole mass spectrometer* (Waters, UK). Die Elektronenspray Ionisierung wurde im Negativ-Ionisierungsmodus durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte in einem BEH C18 Röhrenchen (2,1x100 mm, 1,7 µm). Die mobile Phase bestand aus Wasser mit 0,1% Ameisensäure und 5 mM Ammoniumacetat (*Eluent A*) und Acetonitril (*Eluent B*). Die Analyten wurden in einem Gradienten eluiert. Das Probenvolumen waren 1 µl Galle, 5 µl Serum und 5 µl der in Methanol/Wasser (1:1) resuspendierten Kotproben. Die Temperatur des Reaktionsgefäßes wurde konstant bei 40°C gehalten. Die Detektierung der Gallensäuren und deren Glycin- und Taurinkonjugate erfolgte im *multiple reaction monitoring (MRM) mode*. Weitere Parameter können der Literatur entnommen werden (García-Canaveras et al. 2012).

Probenvorbereitung

10 µL Serum (aus Portal- oder Peripherem-Blut) wurden, gemeinsam mit den internen Deuteriumstandard Mischung aus d4-Ca, d4-GCA und d5-TCA, mit 40 µl kaltem Methanol zur Präzipitation der Proteine gemischt. Die Probe wurde geschüttelt, für 20 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. Nach der Zugabe von 50 µl Wasser wurde der Überstand in LC-MS/MS Analysegefäße überführt. Im Falle der Galleproben wurde 1 µl Gallenflüssigkeit mit 999 µl Wasser und den zuvor beschriebenen Deuteriumstandards verdünnt.

3.5.6 Berechnung des Hydrophobizitätsindex

Basierend auf der Veröffentlichung von Heuman (1989) wurde der Hydrophobizitätsindex (HI) für die Kompartimente Galle, peripheres Blut und Kot berechnet. Grundlage des Hydrophobizitätsindex sind durch HPLC ermittelte Werte für die Balance aus Hydrophilie und Hydrophobie einer jeden Gallensäure (Heuman 1989). Die Hydrophobizitätsindizes der einzelnen Gallensäuren (HI_x) sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Einige Werte konnten von Heuman (1989) nicht experimentell bestimmt werden und wurden aus dem mittleren Unterschied Taurin-konjugierter und Glycin-konjugierter Gallensäuren von +0,07 mathematisch ermittelt. Analog dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die Differenz von Taurin-konjugierten und unkonjugierten Gallensäuren mit einem Unterschied von +0,13 definiert, um ein möglichst breites Spektrum an Gallensäuren für die Berechnung heranziehen zu können. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu erhöhen wurden bei allen Gallensäuren die Werte für die ionisierten Formen der Gallensäuren verwendet.

Tabelle 3-1: Hydrophobizitätsindizes (HI_x) der ionisierten Formen verschiedener Gallensäuren nach Heuman (1989)

Die Werte für unkonjugierte Gallensäuren und ein Teil der Werte für Glycin-konjugierte Gallensäuren wurden mit einem Faktor von +0,13 bzw. einem Faktor von +0,07 aus den gemessenen Werten der Taurin-konjugierten Gallensäuren errechnet.

Gallensäuren	HI _x	HI _x	HI _x
	Taurin-Konjugiert	Glycin-konjugiert	unkonjugiert
α-Muricholsäure	-0,84	-0,79	-0,71
β-Muricholsäure	-0,78	-0,73	-0,65
Hyocholat	-0,45	-0,4	-0,32
Cholat	0	0,07	0,13
Dehydrocholsäure			-0,22
Ursodeoxycholsäure	-0,47	-0,43	0,49
Hyodeoxycholsäure	-0,35	-0,3	0,83
Chenodeoxycholsäure	0,46	0,51	1,37
Deoxycholsäure	0,59	0,65	1,46
Lithocholsäure	1	1,05	1,13

Für die Berechnung der Hydrophobizitätsindizes wurden die absoluten Gallensäurekonzentrationen der Mäuse im jeweiligen Kompartiment (Galle, peripheres Blut, Kot) in ihren Stoffmengenanteil F_x umgerechnet (Formel 1):

$$(1) F_x = \frac{\text{Konzentration der Gallensäure } x}{\text{gesamte Gallensäure Konzentration des Kompartiments}}$$

Der Hydrophobizitätsindex errechnet sich aus der Summe der Produkte aus Stoffmengenanteil F_x und dem Hydrophobizitätsindex der entsprechenden Gallensäure HI_x (Formel 2):

$$(2) HI = \sum_{x=1}^n HI_x * F_x$$

Die statistische Auswertung der errechneten Daten jedes Kompartiments erfolgte jeweils getrennt für beide Geschlechter als Vergleich der Gruppen Wildtyp und Knockout mittels unpaarigem t-Test.

3.5.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Excel berechnet. Der statistische Test, der verwendet wurde wird unter der jeweiligen Abbildung genannt. Bei Datensätzen, die auf Grund signifikant unterschiedlicher Standardabweichungen nicht mit einem normalen t-Test gerechnet werden konnten wurde ein t-Test mit Welch's-Modifikation angewendet. Das Signifikanzniveau wurde für die vorliegende Arbeit mit 5% ($p < 0,05$) definiert. Alle p-Werte unterhalb wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Subzelluläre Lokalisation von SLC10A5 in unterschiedlichen Zelllinien

Die Dissertationen von Pellicoro (Pellicoro, 2008) und Aretz (Aretz, 2015) haben gezeigt, dass SLC10A5 im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Mitgliedern der SLC10-Familie NTCP und ASBT keine Lokalisation in der Plasmamembran aufweist, sondern in vesikulären, membranösen Strukturen innerhalb der Zellen angefärbt werden konnte. Sowohl die Fusion an das fluoreszierende Quallen-Protein GFP, als auch an kleinere Tags wie V5 und FLAG, welche sekundär angefärbt wurden, führte zu einem intrazellulär lokalisierten Signal (Aretz, 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte diese intrazelluläre Lokalisation von SLC10A5 weiter eingegrenzt werden, um eine Aussage über assoziierte Zellkompartimente treffen zu können. Die Leuchtkraft des Konstruktes SLC10A5-GFP wurde in der Dissertation von Aretz (Aretz, 2015) als schwach beschrieben, was eine Kolo-kalisation durch hohe Belichtungszeiten und die damit verbundenen Überschneidungen in den Absorptions- und Emissionsspektren erschweren kann. Deswegen wurde das erstmals 2017 beschriebene Fluoreszenzprotein mScarlet (Bindels et al., 2017) als Alternative zu GFP ausgewählt. mScarlet liegt im Gegensatz zu GFP in einer monomeren Struktur vor und weist eine höhere Lebensdauer und Leuchtkraft als andere fluoreszierende Proteine auf (Bindels et al., 2017). Zusätzlich wurde bei der *in silico* Konstruktion des Fusionsproteins eine kurze repetitive Aminosäuresequenz zwischen SLC10A5 und mScarlet eingefügt, die für Flexibilität und geringere Interaktion der beiden Proteinstrukturen sorgen sollte. Das Fusionsprotein aus SLC10A5 und dem C-terminal gekoppelten mScarlet sollte dabei mit emGFP-gekoppelten Proteinen, die für das jeweilige Zellkompartiment spezifisch waren, in Zellen kotransfiziert werden, um Überlagerungsmuster zu studieren. Die emGFP-gekoppelten Zellorganellenmarker wurden über ein Baculovirus-System in die Zellen eingebracht. Dies ermöglichte eine nahezu 100%-ige Transduktionsrate der Zellen mit den Zellorganellenmarkern bei gleichzeitig sehr geringer Belastung der Zellen, da neben der Baculovirus-Suspension keinerlei weitere Stoffe benötigt wurden. Die Kotransfektion wurde in unterschiedlichen Zelllinien, passend zum Expressionsprofil von SCL10A5 in Leber, Niere und Darm, durchgeführt. In den repräsentativ für den Darm verwendeten Caco-2 Zellen konnte keine Transduktion durch die Baculoviren erreicht werden, weshalb ausschließlich Kolo-kalisationen in Leber- und Nieren-Zelllinien durchgeführt werden konnten.

4.2 Kolokalisationen in HEK293-MSR, HepG2 und Huh-7-Zellen

Repräsentativ für Nierenepithelzellen wurden HEK293-MSR Zellen gewählt. Diese exprimieren den humanen *macrophage scavenger receptor* (MSR), der für eine verbesserte Adhärenz der Zellen in der Kulturschale sorgt. Das Fusionsprotein aus SLC10A5 und mScarlet zeigte, wie es auch für SLC10A5-GFP Konstrukte beschrieben wurde, ein intrazelluläres Färbungsmuster (Abbildung 4-2). Die fluoreszierenden vesikulären Strukturen waren rund und von inhomogener Größe. Außerdem zeigten sie eine Verteilung in der kompletten Zelle und keine Beschränkung auf einzelne Bereiche. Für eine Färbung im Bereich der Plasmamembran gab es keine Anzeichen. Bei der Betrachtung von SLC10A5-mScarlet in Kombination mit den Zellorganellenmarkern gab es rein optisch keine Überschneidungen mit Mitochondrien und Peroxisomen. Bei den Markern für das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat gab es vereinzelt gelb fluoreszierende Areale. Die stärkste Überlagerung der Signale trat mit den frühen und späten Endosomen sowie den Lysosomen auf. Eine 100%-ige Kolokalisation gab es mit keinem der Marker. Es waren immer Bereiche zu sehen, die kein gelbes Signal, als Zeichen einer rot-grün Überlagerung, zeigten. Vergleichend zur Kolokalisation in einer Nieren-Zelllinie wurde der identische Versuchsaufbau in HepG2 und Huh-7-Zellen repräsentativ für die Leber durchgeführt (Abbildung 4-1 und 4-3). In der HepG2-Zelllinie zeigten sich die geringsten Überlagerungen zwischen SLC10A5-mScarlet und den Zellorganellenmarkern für Mitochondrien und Peroxisomen. Einige wenige sichtbare gelbe Signale traten auch hier in der Kombination mit dem ER und dem Golgi-Apparat auf. Die stärksten Überlagerungen waren wieder in den frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen zu sehen. Keiner der Marker erreichte in der Kombination mit SLC10A5-mScarlet eine 100%-ige Übereinstimmung. In den Huh-7-Zellen funktionierte die Transduktion mit den Zellorganellen-Markern für Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum nicht zufriedenstellend, weshalb im Hinblick auf die Ergebnisse aus den HEK293-MSR-Zellen und HepG2-Zellen das Hauptaugenmerk auf die Marker für die vesikulären Zellkompartimente gelegt wurde. In Abbildung 4-3 sind Einzelbilder und Kolokalisation mit den Markern der frühen und späten Endosomen sowie den Lysosomen gezeigt. Auffällig war vor allem, dass sowohl die Zellorganellen als auch SLC10A5-mScarlet in den HepG2-Zellen eine andere Morphologie als in HEK293 und Huh-7-Zellen aufwiesen. Die späten Endosomen und Lysosomen waren größer und die grünen membranösen Strukturen ließen sich von den Hohlräumen der Vesikel abgrenzen. Bei den Lysosomen kam es zu kaum einer direkten Überlagerung von SLC10A5-mScarlet und dem lysosomalen Markerprotein LAMP1-GFP. Die rote SLC10A5-verknüpfte Fluoreszenz lag dafür größtenteils innerhalb der grünen membranösen Strukturen und konnte so indirekt miteinander assoziiert werden. Bei den späten Endosomen war dieser Effekt ebenfalls in abgeschwächter Form zu sehen, zusätzlich zu den auftretenden direkten, gelb gefärbten Überlagerungen der Signale.

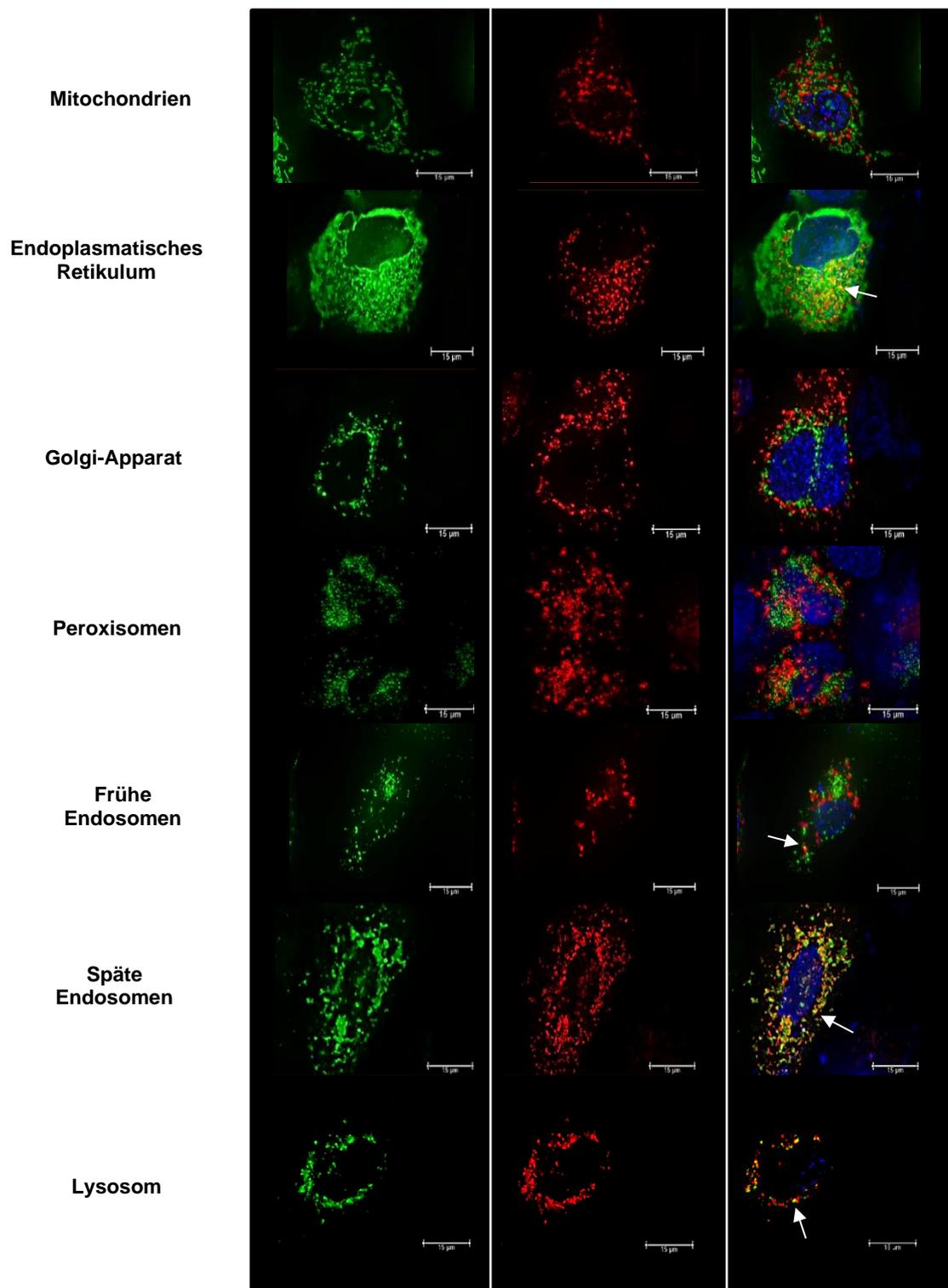


Abbildung 4-1: Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und GFP-gekoppelten Zellorganellenmarkern in HepG2-MSR Zellen

HepG2-MSR Zellen wurden auf ibidi *chamber slides* ausgesät und die lebenden Zellen in PBS unter dem Mikroskop analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gegengefärbt. Die erste Spalte zeigt die transduzierten, GFP-gekoppelten zellorganellenspezifischen Marker (grün). In der zweiten Spalte ist das transient transfizierte SLC10A5-mScarlet Fusionsprotein (rot) gezeigt. In der dritten Spalte ist die Überlagerung des roten, grünen und blauen Kanals gezeigt. Überlagerte Signale von rot und grün stellten sich in gelber Farbe dar. Beispiele dafür sind mit weißen Pfeilen markiert. Alle Aufnahmen sind Maximum-Projektionen von dekonvolutionierten Z-Stapeln in 630-facher Vergrößerung.

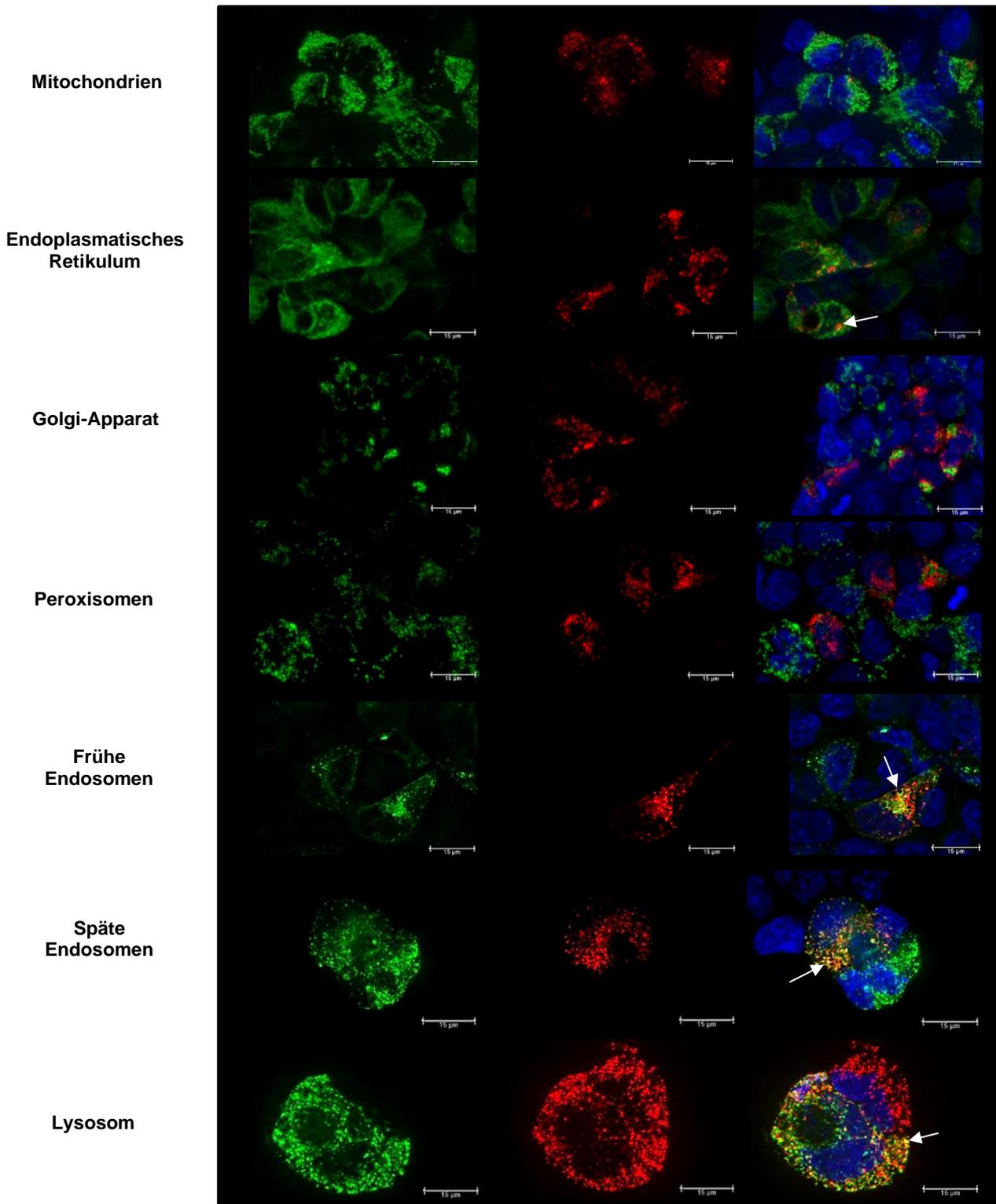


Abbildung 4-2: Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und GFP-gekoppelten Zellorganellenmarkern in HEK293- Zellen

HEK293-Zellen wurden auf ibidi *chamber slides* ausgesät und die lebenden Zellen in PBS unter dem Mikroskop analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gegengefärbt. Die erste Spalte zeigt die transduzierten, GFP-gekoppelten zellorganellenspezifischen Marker (grün). In der zweiten Spalte ist das transient transfizierte SLC10A5-mScarlet Fusionsprotein (rot) gezeigt. In der dritten Spalte ist die Überlagerung des roten, grünen und blauen Kanals gezeigt. Überlagerte Signale von rot und grün stellen sich in gelber Farbe dar. Beispiele dafür sind mit weißen Pfeilen markiert. Alle Aufnahmen sind Maximum-Projektionen von dekonvolutionierten Z-Stapeln in 630-facher Vergrößerung.

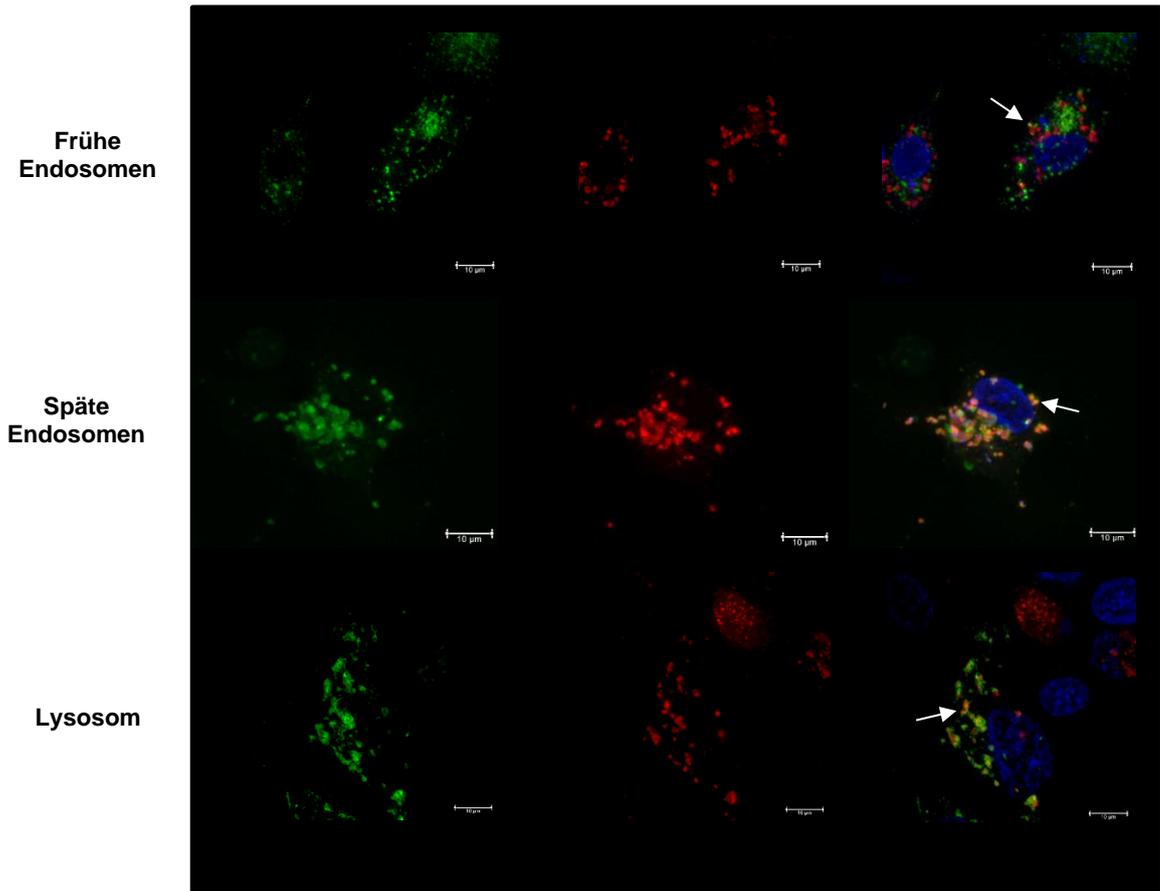


Abbildung 4-3: Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und GFP-gekoppelten Zellorganellenmarkern in Huh-7-Zellen

Huh-7-Zellen wurden auf ibidi *chamber slides* ausgesät und die lebenden Zellen in PBS unter dem Mikroskop analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gegengefärbt. Die erste Spalte zeigt die transduzierten, GFP-gekoppelten zellorganellenspezifischen Marker (grün) für frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen. In der zweiten Spalte ist das transient transfizierte SLC10A5-mScarlet Fusionsprotein (rot) gezeigt. In der dritten Spalte ist die Überlagerung des roten, grünen und blauen Kanals zu sehen. Überlagerte Signale von rot und grün stellen sich in gelber Farbe dar. Beispiele dafür sind mit weißen Pfeilen markiert. Alle Aufnahmen sind Maximum-Projektionen von dekonvolutionierten Z-Stapeln in 630-facher Vergrößerung.

Mathematische Berechnung der Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und GFP gekoppelten Zellorganellenmarkern in HEK293-Zellen

Mit Hilfe der Leica-Software des Mikroskops konnten die optisch gewonnenen Eindrücke zur Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und Zellorganellen in Form von Zahlen ausgedrückt werden (Abbildung 4-4). Das Programm berechnet dabei die Korrelation der jeweiligen Datensätze und gibt sie in Form des Pearson-Koeffizienten (P) sowie einer Kolokalisationsrate (KR) aus. Die optischen Eindrücke, die durch die Bilder gezeigt wurden, konnten mit den mathematischen Daten zur Kolokalisation bestätigt werden. In den Mitochondrien ($KR = 1,19\% \pm 0,64$) und Peroxisomen ($KR = 5,38\% \pm 2,08$) waren die Signalüberlagerungen am geringsten. Golgi-Apparat ($KR = 16,85\% \pm 2,48$) und das Endoplasmatische Retikulum ($KR = 39,85\% \pm 8,80$) wiesen etwas stärkere Überlagerungen auf. Wie auch optisch zu sehen, waren die Signalüberlagerungen in den vesikulären Zellkompartimenten mit Kolokalisationsraten von $57,05\% \pm 6,09$ in den frühen Endosomen, $79,60\% \pm 3,66$ in den späten Endosomen und $74,46\% \pm 8,41$ in Lysosomen. Auffällig ist hierbei, dass die errechnete Überschneidung in den Lysosomen etwas geringer ist als in den späten Endosomen.

Kompartiment	Pearson Koeffizient	Überlagerungs Koeffizient	Kolokalisations-Rate
Mitochondrien	0,11±0,02	0,27±0,07	1,19%±0,64
ER	0,25±0,07	0,36±0,05	39,58%±8,80
Golgi	0,13±0,01	0,20±0,01	16,85%±2,48
Peroxisomen	0,04±0,01	0,13±0,03	5,38%±2,08
Frühe Endosomen	0,41±0,04	0,53±0,03	57,05%±6,09
Späte Endosomen	0,65±0,05	0,74±0,04	79,60%±3,66
Lysosom	0,77±0,05	0,81±0,05	74,46%±8,41

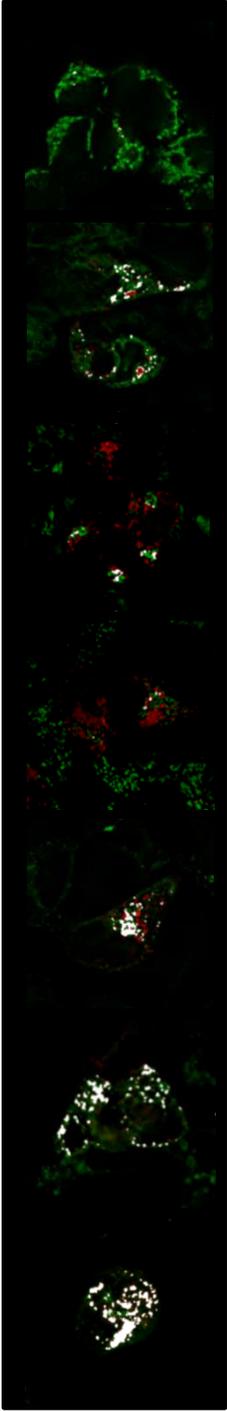


Abbildung 4-4: Statistiken zur Kolokalisation von SLC10A5-mScarlet und organellenspezifischen Markern in HEK293-MSR Zellen

Die Berechnung des Pearson Koeffizienten, Überlagerungskoeffizienten und der Kolokalisationsrate erfolgte durch die Leica-Software am Mikroskop. Ausschließlich Zellen, in denen beide Signale sichtbar waren, wurden markiert und für die Berechnung herangezogen. Dieser Vorgang wurde an unterschiedlichen Einzelbildern jeweils aus der schärfsten Ebene von Z-Stapeln durchgeführt und anschließend die hier gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Bilder zeigen SLC10A5-mScarlet in Rot, GFP-gekoppelte Organellenmarker in Grün und die sich überlagernden Bereiche in Weiß.

4.3 Gewebelokalisation von SLC10A5

Um die subzelluläre Lokalisation von SLC10A5 weiter zu charakterisieren und die Ergebnisse aus dem Zellkulturmodell zu bestätigen, war die Färbung des nativen Proteins in Organen von Mäusen ein weiterer wichtiger Schritt. In vorangegangenen Arbeiten scheiterten Untersuchungen im Gewebe meist an unspezifisch bindenden Antikörpern (Pellicoro, 2008), weshalb in der vorliegenden Arbeit der direkte Vergleich zwischen Geweben von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen in Kombination mit einem selbst generierten Antikörper gewählt wurde. Um einen spezifischen Antikörper gegen SLC10A5 zu erstellen, wurden zwei Epitope des Mausproteins gewählt und eine Immunisierung von Kaninchen in Auftrag gegeben. Zwei unterschiedliche Antikörper, die gegen verschiedene Epitope gerichtet waren, wurden aufgereinigt, mittels ELISA auf ihre Reaktivität untersucht und im Rahmen dieser Doktorarbeit getestet. Lebern und Nieren von transkardial perfundierten *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen wurden in *Tissue-Tek* eingebettet und Gefrierschnitte angefertigt. Getestet wurden aufgereinigte Antikörper und komplettes Antiserum. Als Negativkontrollen dienten Präimmunsereen der Kaninchen und das Färben mit ausschließlich dem zweiten Antikörper.

In allen Versuchen zeigten sich nur bei den aufgereinigten Antikörpern Färbemuster im Gewebe. Antikörper 7648, der gegen ein Epitop in einer der cytoplasmatischen Schleifen von SLC10A5 gerichtet ist, führte sowohl in *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen zu unspezifischen Färbungen. Der gegen das C-terminale Ende des murinen SLC10A5-Proteins gerichtete Antikörper 7649 zeigte eine spezifische Färbung des Proteins in den Wildtyp-Organen und keinerlei Reaktivität im Gewebe der Knockout-Mäuse (Abbildung 4-5). Alle gezeigten Bilder wurden mit dem aufgereinigten Antikörper 7649 in einer Verdünnung von 1:1500 durchgeführt. Bei den unterschiedlichen Organen zeigten sich Färbungen in der Leber und in den Nieren-Schnitten, wohingegen in keinem der Darmabschnitte eine spezifische Färbung von SLC10A5 erreicht werden konnte.

In der Leber zeigte sich im Überblick über größere Gewebebereiche eine homogene Färbung fast aller Hepatozyten. Diese homogene Färbung variierte auf Ebene der Periportalfelder in ihrer Intensität. In der Detailansicht zeigte sich, dass fast jeder Zellkern mit naheliegenden Fluoreszenzsignalen assoziiert werden konnte. Das Färbemuster war auch im Gewebe, ähnlich wie in den Versuchen im Zellkulturmodell, nicht in der Plasmamembran zu sehen, sondern beschränkt auf intrazelluläre, vesikuläre Strukturen. Diese zeigten leichte Variationen in ihrer Größe. Die gleiche Feinstruktur war auch in den gefärbten Schnitten des Nierengewebes zu sehen. In der Übersicht waren die angefärbten Strukturen auch hier über das ganze Gewebe verteilt. Im Gegensatz zum Lebergewebe beschränkte sich die Lokalisation von SLC10A5 im Nierengewebe jedoch auf bestimmte Zellen und tubuläre

Strukturen mit isoprismatischem Epithel. Zusätzlich waren auch Proteinfärbungen in nicht näher definierbaren Anteilen des Glomerulums zu sehen. Diese zeigten sich als feine Linien innerhalb des kompletten glomerulären Apparats.

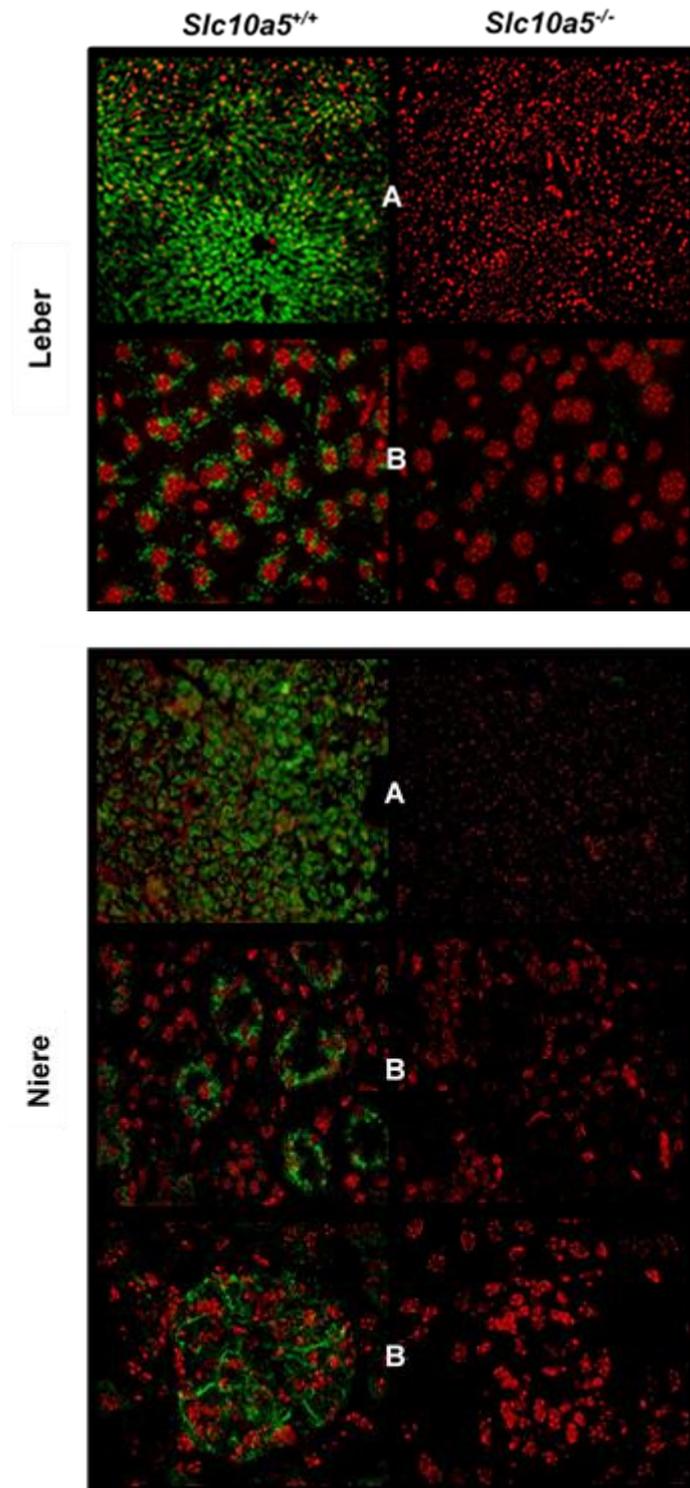


Abbildung 4-5: Immunfluoreszenzfärbung von SLC10A5 in Leber- und Nierengewebe von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen.

Übersichtsbilder der Gewebeschnitte (A) wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen, Detailbilder (B) bei 630-facher Vergrößerung. Die linke Spalte zeigt die Färbungen im Gewebe der *SLC10a5*^{+/+} Wildtyp-Mäuse, die rechte Spalte die Färbung im Gewebe der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse.

SLC10A5 wurde mit dem selbst generierten Antikörper „7649“ markiert und ist in grün dargestellt. Als sekundärer Antikörper diente *Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit*. Die Gegenfärbung der Zellkerne (rot) erfolgte im Eindeckelmedium mit DAPI. Alle Bilder zeigen Überlagerungen des roten und grünen Kanals und sind Maximum-Projektionen von dekonvolvierten Z-Stapeln. Die Berechnung der Dekonvolution erfolgte mit 20 Iterationen.

In Kryoschnitten aus der Leber wurde, ergänzend zur Kolokalisation in der Zellkultur, eine Überlagerung von SLC10A5 und LAMP-1, einem lysosomalen Membranprotein, untersucht. Das Lysosom wurde gewählt, da es den Endpunkt der endosomalen Reifung der Vesikel darstellt und eine kritische Betrachtung der Ergebnisse aus der Kolokalisation im Zellkulturmodell erlaubt. Es zeigte sich eine Überlagerung der Signale mit einem Pearson-Koeffizienten von 0,38 und einer Kolokalisations-Rate von 23,76% und damit deutlich niedriger als im Zellkulturmodell (Abbildung 4-6). Rein optisch unterschieden sich die Signale von SLC10A5 und LAMP-1 vor allem in Größe und Form. Die LAMP-1 Areale waren etwas größer und heterogener geformt als die gezeigten SLC10A5 Strukturen.

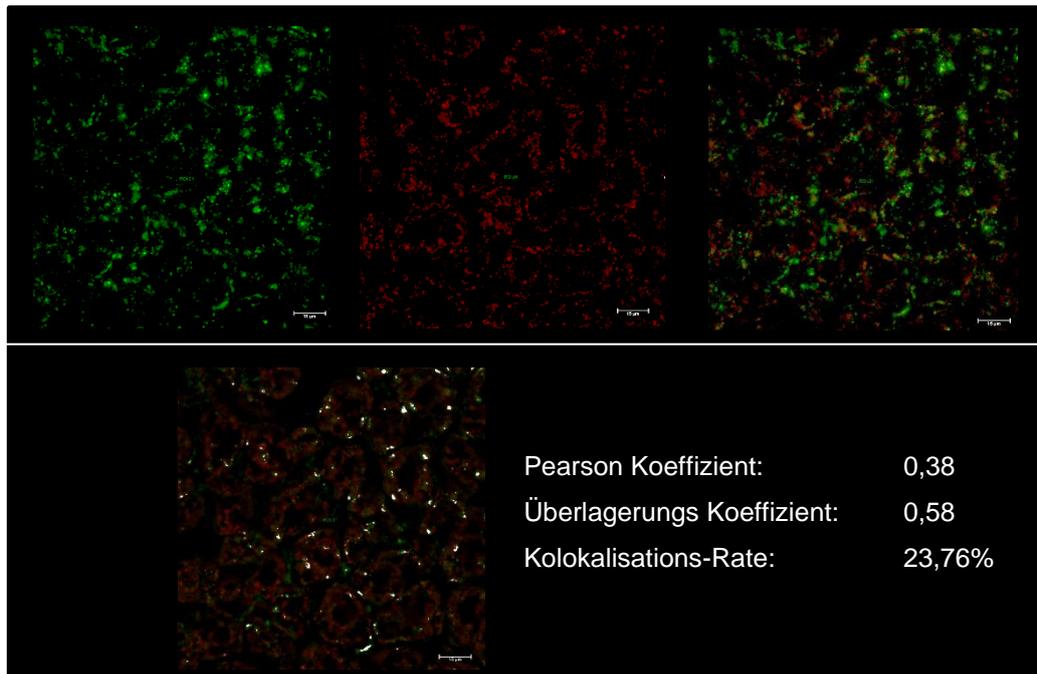


Abbildung 4-6: Kolokalisation von SLC10A5 und LAMP-1 im Mausgewebe

SLC10A5 wurde in Kryoschnitten mit dem selbst generierten Antikörper „7649“ in einer Verdünnung von 1:1500 zusammen mit einem gegen das lysosomale Membranprotein LAMP-1 gerichteten Antikörper gefärbt. Der Sekundäntikörper für 7649 war Alexa Fluor 488 (grün), der verwendete LAMP-1 Antikörper war direkt an Alexa Fluor 594 (rot) gekoppelt. In der oberen Reihe sind die einzelnen Kanäle, sowie die Überlagerung gezeigt, das Bild in der unteren Reihe zeigt die von der Software erkannten überlagerten Bereiche. Pearson-Koeffizient, Überlagerungs-Koeffizient und Kolokalisationsrate wurden direkt in der verwendeten Software des Mikroskops in verschiedenen Ebenen berechnet und sind Mittelwerte der Einzelbilder.

4.4 Transportmessungen mit SLC10A5

Die molekulare Funktion von SLC10A5 ist bislang nicht beschrieben. Eine mögliche Aktivität als Transporter wurde im Rahmen mehrerer wissenschaftlicher Arbeiten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht. In *Xenopus laevis* Oozyten gab es keinerlei Transportaktivität für die beiden Gallensäuren Cholat und Taurocholat sowie die Steroidhormone DHEAS und Estron-3-Sulfat (Fernandes et al., 2007). Der Transport im Zellkulturmodell wurde erstmals an HEK293-Zellen untersucht. Unterschiedliche, radioaktiv markierte Gallensäuren wurden dabei auf ihren Transport über die Plasmamembran und eine intrazelluläre Aufnahme durch Digitonin-Permeabilisierung der Zellmembran untersucht. Es konnte jedoch für keine der untersuchten Gallensäuren ein Transport festgestellt werden (Aretz, 2015). Durch die intrazelluläre Lokalisation hat SLC10A5 möglicherweise andere Anforderungen, damit eine Aktivität als Transportsystem gezeigt werden kann. Um diese Anforderungen näher zu untersuchen, wurden weitere Transportversuche mit [³H]-markierten Gallensäuren durchgeführt.

4.4.1 Transportmessung mit einer SLC10A5/NTCP Chimäre

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass SLC10A5 keine Plasmamembranlokalisation wie z.B. NTCP, ASBT oder SOAT aufweist. Dadurch mussten auch Transportexperimente an die veränderten Bedingungen angepasst werden. Eine Möglichkeit, dennoch einen Transport über die Plasmamembran zu zeigen, ist die Veränderung der Lokalisation des Proteins. Damit SLC10A5 in die Plasmamembran sortiert werden kann, wurde eine Chimäre aus SLC10A5 und NTCP generiert (Abbildung 4-7). Für die strikte Sortierung von NTCP in die Plasmamembran ist unter anderem das C-terminale Ende des Proteins verantwortlich (Sun et al., 1998) (Schmidt et al., 2015). Um diesen Effekt des C-Terminus von NTCP auszunutzen, wurden die letzten 24 Aminosäuren von SLC10A5 durch die letzten 39 Aminosäuren von NTCP ersetzt. Die Schnittstelle wurde auf Grund der Ähnlichkeit der Sequenzen beider Proteine ausgewählt. Die fertige SLC10A5ctNTCP Chimäre zeigte nach Anfärbung des C-terminalen FLAG-Tags eine starke Plasmamembranexpression mit Ähnlichkeit zur Expression von NTCP.

A

SLC10A5ctNTCP	VAMCSGCEMLLI	AIFWCYEKFK	----	TPKDKTKMIYT	AATTEET	IPGALGNGTYK	GEDCSPCTADY	KDDDDK
SLC10A5	VAMCSGCEMLLI	ILVYKAKKRC	IFFLQDKRRNFLI	-----	-----	-----	-----	-----
NTCP	MIFQLGEGLLLI	AIFWCYEKFK	----	TPKDKTKMIYT	AATTEET	IPGALGNGTYK	GEDCSPCTA	-----

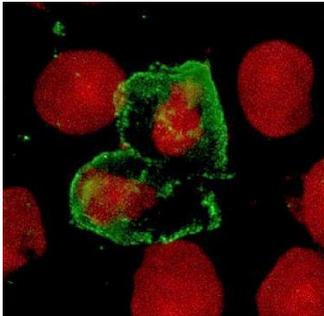
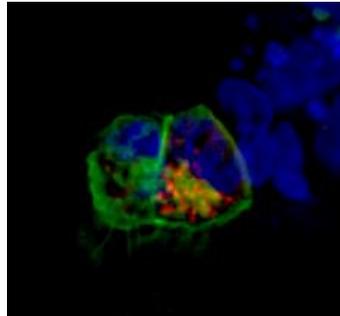
B SLC10A5ctNTCP: grün**C NTCP: grün; SLC10A5: rot**

Abbildung 4-7: Fusionsstelle von SLC10A5 und NTCP für die SLC10A5ctNTCP-Chimäre

A: Gezeigt ist ein *Alignment* der Sequenzen von SLC10A5, NTCP und der daraus entstandenen Chimäre. Um eine Expression von SLC10A5 in der Plasmamembran zu erzielen wurde ein in beiden Proteinen ähnlicher Bereich gewählt um die Chimäre zu erzeugen. Nach Position 415 des SLC10A5 Proteins wurden die letzten 39 Aminosäuren des C-terminalen Endes von NTCP anstelle des normalen SLC10A5 C-Terminus (24 Aminosäuren) genutzt (roter Strich).

B: Die Expression der SLC10A5ctNTCP-Chimäre wurde durch eine Immunfluoreszenz-Färbung überprüft. Die Färbung erfolgte über den C-terminalen *FLAG-tag* mit einem AlexaFluor488 Antikörper (grün). Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst33342 (rot). Die Zellen waren fixiert und permeabilisiert.

C: In grün dargestellt ist NTCP, angefärbt mit einem gegen das N-Terminale HA-Tag gerichteten Antikörper. In rot dargestellt ist SLC10A5, angefärbt mit einem gegen das C-terminale FLAG-Tag gerichteten Antikörper. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst33342 (blau). Die Zellen waren fixiert und permeabilisiert. Alle Bilder sind Maximum-Projektionen dekonvolutionierter Z-Stapel in 400-facher Vergrößerung.

Die Transportaktivität dieser Chimäre wurde in stabil transfizierten SLC10A5ctNTCP-HEK293-Zellen gemessen (Abbildung 4-8). Die Messungen wurden bei den pH-Werten 7,4 und 5,5 mit natriumhaltigem Transportpuffer bei 37°C durchgeführt. Als Kontrollzellen dienten SLC10A5ctNTCP-HEK293-Zellen, die nicht mit Tetrazyklin induziert wurden. In den gezeigten Transportmessungen konnte für die unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Deoxycholat und Ursodeoxycholat, die Taurin-konjugierten Gallensäuren Taurocholat, Taurodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat und Taurolithocholat, die Glycin-konjugierten Gallensäuren Glycodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat, Glycochenodeoxycholat und die Aminosäure Taurin weder bei einem pH-Wert von 7,4 noch bei einem pH-Wert von 5,5 ein Transport festgestellt werden. Auf die Darstellung der statistischen Auswertung der Daten wurde verzichtet, da kein relevanter Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen, der auf einen Transport hindeuten würde, festgestellt wurde.

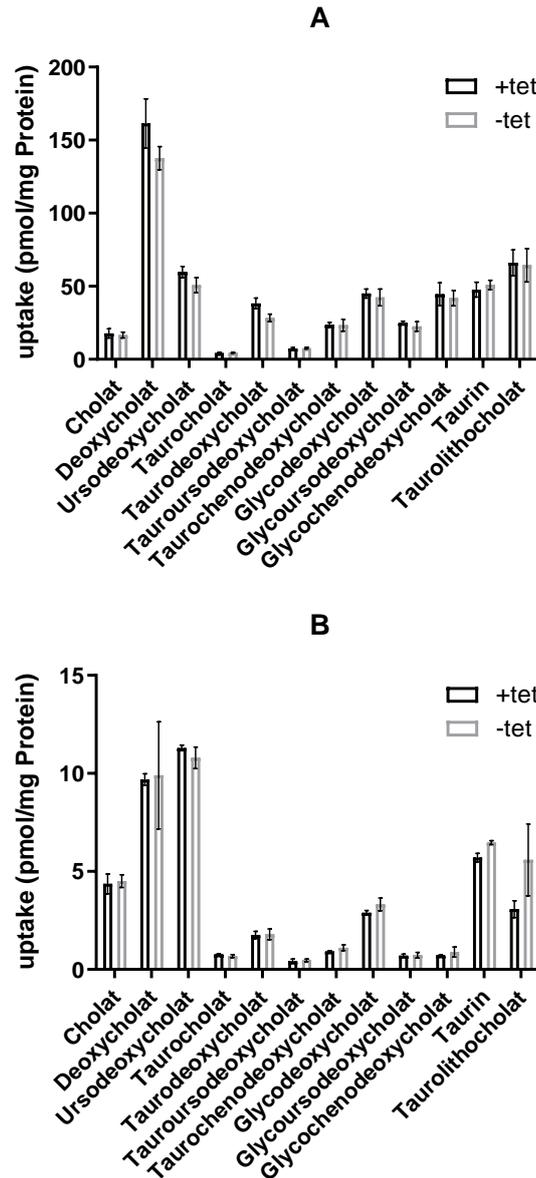


Abbildung 4-8: Untersuchung der Transportaktivität einer SLC10A5/NTCP Chimäre über die Plasmamembran

Stabil transfizierte SLC10A5ctNTCP-HEK293-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten 24-well Platten ausgesät. Die Hälfte der ausgesäten wells wurde mit Tetrazyklin induziert. Die Transportmessung wurde mit 11 unterschiedlichen Tritium-markieren Gallensäuren und Tritium markiertem Taurin bei 37°C durchgeführt. Die Konzentration der zu messenden Substanzen wurde auf 1 μ M eingestellt, bei einem radioaktiven Anteil von 6 bis 15 nM. Die Inkubationszeit mit dem Transportpuffer betrug 10 min. **A** zeigt die Messung bei einem pH-Wert von 7,4 (n=4), **B** die Messung bei einem pH-Wert von 5,5 (n=3). Als Negativkontrolle dienen nicht-induzierte SLC10A5ctNTCP-HEK293 Zellen, welche lediglich eine basale Expression des stabil transfizierten Proteins zeigen. Alle Werte der Flüssigszintillationsmessung wurden auf die mittels Lowry-Methode bestimmten Proteinwerte bezogen und sind dargestellt als pmol radioaktive Substanz pro mg Protein. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Ergebnisse wurden mittels eines T-tests zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen für jede Gallensäure durchgeführt. Dabei traten keinerlei statistische Signifikanzen auf.

4.4.2 Transportmessung in Membranvesikeln

Eine weitere Möglichkeit, die Transportaktivität von Proteinen zu untersuchen, sind Membranvesikel. Diese künstlich generierten Membranhüllen ermöglichen ein vereinfachtes Transportsystem. Um die Membranvesikel zu synthetisieren, wurden stabil transfizierte SLC10A5-V5-HEK293 Zellen und HEK293-FlpIn Kontrollzellen in hypotonem Puffer zum Aufquellen gebracht, durch Scherkräfte zerstört und die Membranreste durch Ultra-Zentrifugation vom Zelldetritus getrennt. Die am Ende übrig gebliebenen Zellmembranreste mit dem integrierten, überexprimierten Protein wurden durch Injektionskanülen gedrückt. Die turbulente Strömung, die sich in der Kanüle bildete, führte zum Kreisschluss der Membranreste und zur Bildung von Vesikeln unterschiedlicher Größe. Die Vesikel liegen dabei als *right-side-out* Vesikel vor, die eine normale Ausrichtung der Membran haben und als *inside-out* Vesikel mit einer inversen Ausrichtung der Membran. Als Positivkontrolle dienten BSEP-HEK293-Vesikel, die mit bzw. ohne ATP gemessen wurden. Die Vesikel der SLC10A5-V5-HEK293- und HEK293-FlpIn-Zellen wurden dann mit verschiedenen radioaktiv markierten Substraten auf ihre Transportaktivität untersucht (Tabelle 4-1). Alle Messungen erfolgten bei 37°C im gleichen Puffer, in dem die Vesikel hergestellt wurden. Der Messpuffer der BSEP-Vesikel enthielt zusätzlich 4 mM ATP. Die BSEP-HEK293-Vesikel, die als Positivkontrolle dienen sollten, zeigten in den Messungen mit ATP im Puffer eine erhöhte Aufnahme von [³H]-Taurocholat. Dies war die Bestätigung der Methodik und erfolgreichen Herstellung der Vesikel. Die SLC10A5-V5-HEK293-Vesikel zeigten keine erhöhte Aufnahme der Aminosäure Taurin, den unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Deoxycholat und Ursodeoxycholat oder den Taurin-konjugierten Gallensäuren Taurocholat, Taurodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat und Taurolithocholat. Zur besseren Veranschaulichung dieser Ergebnisse wurden die Quotienten aus den Zerfällen pro Minute der Vesikel und der jeweiligen Kontroll-Vesikel Gruppe gebildet. Es zeigte sich ausschließlich bei den BSEP-Kontroll-Vesikeln ein Verhältnis über 2, was auf einen Transport des Substrats schließen ließ. Alle anderen Quotienten blieben unter einem Wert von 2. Lediglich die Quotienten der Taurin-Messung wiesen eine erhöhte Tendenz mit 1,28:1 bei pH 7,4 und 1,49:1 bei pH 5,5 auf.

Tabelle 4-1: Transportversuch mit verschiedenen radioaktiv markierten Gallensäuren in Membranvesikeln

Membranvesikel wurden mittels Ultra-Zentrifugation aus stabil transfizierten P5V5His-HEK293-Zellen und HEK293-FlpIn-Kontrollzellen generiert und für den Transportversuch mit Tritium-markierten Gallensäuren und Tritium-markiertem Taurin inkubiert. (A) Die Inkubationsdauer betrug 2 min bei 37°C im gleichen Sucrosepuffer, welcher auch zur Herstellung der Vesikel verwendet wurde. Gemessen wurde die Transportaktivität sowohl bei pH 7,4 als auch pH 5,5. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit eiskaltem PBS. Als Positivkontrolle wurden BSEP-HEK293-Vesikel mit [³H]-Taurocholat auf ihre Transportaktivität untersucht (B). Der pH-Wert des verwendeten Puffers lag bei diesen Messungen bei 7,4 und es war zusätzlich ATP in einer Konzentration von 4 mM zugegeben. Die Konzentration aller Substanzen wurde mit in DMSO gelösten Gallensäuren, bzw. in ddH₂O gelöstem Taurin auf 1 µM eingestellt. Die Menge an radioaktiver Substanz wurde jeweils so gewählt, dass pro Messpunkt 200.000 *counts* eingesetzt wurden. Dargestellt sind auf die jeweilige Standardlösung normierte Mittelwerte der Zerfälle pro Minute und deren Standardabweichungen in Dreifachbestimmung und die Verhältnisse von P5V5His-Vesikeln zu den jeweiligen FlpIn-Vesikeln. Mittels eines T-tests wurden P5V5His-Vesikel bzw. BSEP-Vesikel gegenüber den jeweiligen Kontroll-Vesikeln auf statistische Signifikanz überprüft. Nur für die BSEP -Vesikel konnte dabei eine statistische Signifikanz festgestellt werden (p<0,05).

A	pH 7,4			pH 5,5		
	P5V5His-Vesikel	FlpIn-Vesikel	Quotient	P5V5His-Vesikel	FlpIn-Vesikel	Quotient
[³ H]-Taurin	552±171	430±63	1,28:1	565±214	377±31	1,49:1
[³ H]-Cholat	2841±776	4508±1047	0,63:1	7298±1651	9764±931	0,75:1
[³ H]-Deoxycholat	6326±463	7419±1077	0,85:1	7708±584	8116±182	0,94:1
[³ H]-Ursodeoxycholat	5043±1211	5437±1167	0,92:1	6420±897	6754±349	0,95:1
[³ H]-Taurocholat	9465±341	9948±413	0,95:1	7170±957	7492±260	0,96:1
[³ H]-Taurodeoxycholat	25455 ±879	24828 ±310	1,03:1	60986 ±7352	65253 ±5243	0,93:1
[³ H]-Taurochenodeoxycholat	9387±1617	10688±661	0,87:1	9722±258	8499±755	1,14:1
[³ H]-Tauroursodeoxycholat	6577±975	7315±446	0,89:1	11583±1421	10018±1411	1,16:1
[³ H]-Tauroolithocholat	85570±167 93	100764±1284 9	0,84:1	103134±11676	83289±6100	1,24:1

B	BSEP-Vesikel	FlpIn-Vesikel	Verhältnis
[³ H]-Taurocholat	2195±369	953±428	2,3:1

4.5 Gallensäurestoffwechsel der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

4.5.1 Rückkreuzungsstatus der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse

Um die Relevanz und Funktion von SLC10A5 für den Organismus zu ergründen reichte es nicht aus, die Lokalisation und die molekulare Funktion getrennt zu betrachten. Das Knockoutmaus-Modell ermöglicht eine ganzheitliche Betrachtungsweise von SLC10A5 im Körper. Voraussetzung dafür ist, dass man im Vergleich zwischen Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nur das Zielgen als Unterschied im Genom betrachten kann. Die über mehrere Generationen auf ihren C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzten *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse wurden dazu mit dem *Speed congenics*¹ SNP-Panel auf ihren genetischen Status untersucht. Das Ergebnis dieser Polymorphismen Analyse war ein Generationsäquivalent von 8 mit einer 99,77%igen Übereinstimmung zum C57BL/6N-Rückkreuzungshintergrund. Lediglich ein Bereich von etwa 32 Millionen Basenpaaren auf Chromosom 3, der sich in direkter Nachbarschaft des *Slc10a5*-Genknockouts befindet, zeigte noch Charakteristika der 129SvEvBrd Mauslinie, in welcher der Genknockout erzeugt wurde. Solche *passenger-genes* müssen kritisch betrachtet werden, um Unterschiede zwischen Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen aussagekräftig auf den Knockout des Zielgens beziehen zu können. Tabelle 4-2 zeigt eine Auflistung aller Gene, die sich in diesem Bereich befinden. Nicht dargestellt sind vorhergesagte Gene und Pseudogene, die in diesem Genombereich liegen. Die meisten aufgelisteten Gene standen entweder auf Grund ihrer Lokalisation oder ihrer beschriebenen Funktion nicht in direktem Zusammenhang mit *Slc10a5*. Für einige Gene gab es noch keine bekannte Funktion, mit der sich Rückschlüsse ziehen lassen konnten. Einen direkten Bezug zu *Slc10a5* und dem Gallensäurestoffwechsel hatte nur *Cyp7b1*. Dieses Gen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit detaillierter betrachtet und Unterschiede in der Genexpression zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen untersucht.

¹Die Genomanalyse des *Speed congenics* SNP-Panels basiert auf der Analyse von 1440 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Sofern sich die SNPs zwischen den analysierten Mauslinien unterscheiden kann eine Zuordnung zu einer der Linien erfolgen. So wird über das gesamte Panel hinweg ein Prozentsatz der Übereinstimmung des Genoms mit in diesem Fall C57BL/6N-Mäusen oder 129SvEvBrd-Mäusen ermöglicht. Details zur Methode finden sich in Kapitel 3.5.2.

Tabelle 4-2: Nicht-rekombinierter Genbereich der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus wurde über mehrere Generationen auf einen C57BL6/N-Hintergrund zurückgekreuzt. Die *Speed congenics* Ergebnisse zeigten, dass nur auf Chromosom 3 in direkter Nachbarschaft zum Gen-Locus von *Slc10a5* Bereiche zu finden sind, die immer noch der 129SvEvBrd-Mauslinie entsprechen, in der der Gen-Knockout erzeugt wurde. Diese Gene können im Vergleich zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen zu Unterschieden führen, die nicht in Zusammenhang mit dem eigentlich betrachteten Gen stehen. Pseudogene und vorhergesagte Gene wurden nicht berücksichtigt.

Gensymbol	Strang	Name
<i>Hnf4g</i>	+	hepatocyte nuclear factor 4 gamma
<i>Zfx4</i>	+	zinc finger homeodomain 4
<i>Pex2</i>	-	peroxisomal biogenesis factor 2
<i>Pkia</i>	+	cAMP-dependent protein kinase inhibitor alpha
<i>Zc2hc1a</i>	+	zinc finger, C2HC-type containing 1A
<i>Il7</i>	-	interleukin 7
<i>Stmn2</i>	+	stathmin-like 2
<i>Hey1</i>	-	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
<i>Mrps28</i>	-	mitochondrial ribosomal protein S28
<i>Tpd52</i>	-	tumor protein D52
<i>Zbtb10</i>	+	zinc finger and BTB domain containing 10
<i>Zfp704</i>	-	zinc finger protein 704
<i>Pag1</i>	-	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
<i>Fabp5</i>	+	fatty acid binding protein 5, epidermal
<i>Pmp2</i>	-	peripheral myelin protein 2
<i>Fabp9</i>	-	fatty acid binding protein 9, testis
<i>Fabp4</i>	-	fatty acid binding protein 4, adipocyte
<i>Fabp12</i>	-	fatty acid binding protein 12, eye
<i>Impa1</i>	-	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1
<i>Slc10a5</i>	-	solute carrier family 10, member 5
<i>Zfand1</i>	-	zinc finger, AN1-type domain 1
<i>Chmp4c</i>	+	OTTMUSP00000034830 charged multivesicular body protein 4C
<i>Snx16</i>	-	sorting nexin 16
<i>Raly1</i>	+	RALY RNA binding protein-like
<i>Slc7a12</i>	+	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 12
<i>Lrrcc1</i>	+	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1
<i>E2f5</i>	+	E2F transcription factor 5
<i>Car13</i>	+	carbonic anhydrase 13
<i>Car1</i>	-	carbonic anhydrase 1
<i>Car3</i>	+	carbonic anhydrase 3
<i>Car2</i>	+	carbonic anhydrase 2
<i>Sirpb1a</i>	-	signal-regulatory protein beta 1A
<i>Sirpb1b</i>	-	signal-regulatory protein beta 1B
<i>LOC100038947</i>	-	signal-regulatory protein beta 1-like
<i>Gm5150</i>	-	SIRP beta 1 like 1 protein
<i>Ythdf3</i>	+	YTH domain family 3
<i>Mir124a-2</i>	+	microRNA 124a-2
<i>Cypt12</i>	+	cysteine-rich perinuclear theca 12
<i>Bhlhe22</i>	+	basic helix-loop-helix family, member e22

Cyp7b1	-	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1
<i>Armc1</i>	-	armadillo repeat containing 1
<i>Mtfr1</i>	+	mitochondrial fission regulator 1
<i>Pde7a</i>	-	phosphodiesterase 7A
<i>Dnajc5b</i>	+	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C5 beta
<i>n-Tr3</i>	-	nuclear encoded tRNA arginine 3 (anticodon ACG)
<i>n-Ty1</i>	+	nuclear encoded tRNA tyrosine 1 (anticodon GTA)
<i>n-Ty2</i>	+	nuclear encoded tRNA tyrosine 2 (anticodon GTA)
<i>n-Ta14</i>	+	nuclear encoded tRNA alanine 14 (anticodon AGC)
<i>Trim55</i>	+	tripartite motif-containing 55
<i>Crh</i>	-	corticotropin releasing hormone
<i>LOC102633274</i>	-	WW domain-binding protein 5-like
<i>Gm17771</i>	+	zinc finger protein 320-like
<i>Cp</i>	+	ceruloplasmin
<i>Hps3</i>	-	Hermansky-Pudlak syndrome 3
<i>Hltf</i>	+	helicase-like transcription factor
<i>Gyg</i>	-	glycogenin
<i>Cpa3</i>	-	carboxypeptidase A3, mast cell
<i>Cpb1</i>	-	carboxypeptidase B1 (tissue)
<i>Agtr1b</i>	-	angiotensin II receptor, type 1b
<i>Tbl1xr1</i>	+	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1
<i>Rprl2</i>	+	ribonuclease P RNA-like 2
<i>Naaladl2</i>	-	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2
<i>n-Tl13</i>	-	nuclear encoded tRNA leucine 13 (anticodon CAG)
<i>Nlgn1</i>	-	neuroligin 1

4.5.2 Genotypisierung und Zucht der Mauslinien

Die Zucht der *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse für die Untersuchung des Gallensäurestoffwechsels unter Standardfütterungsbedingungen erfolgte in zwei unterschiedlichen Mauslinien am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Knockoutmäuse kamen aus Anpaarungen von homozygoten *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen. Die Wildtyp-Mäuse kamen aus Anpaarungen von homozygoten C57BL/6N Mäusen. Im Gegensatz zur Verpaarung von heterozygoten Mäusen reduziert die Zucht mit ausschließlich homozygoten Tieren die Anzahl an nicht für die Untersuchung nutzbarer Tiere drastisch, worauf die Entscheidung für dieses Vorgehen begründet war. Alle Mäuse wurden auf ihren genetischen *Slc10a5*-Status untersucht. Dazu wurde eine Genotypisierungs-PCR etabliert, die die klare Trennung von Wildtyp-, Knockout- oder heterozygoten Tieren ermöglichte. Die zwei Primerpaare der *Slc10a5*-Genotypisierung erzeugten in der PCR DNA-Fragmente von 362 Basenpaare (Knockout) bzw. 180 Basenpaare (Wildtyp). Das Ergebnis einer Genotypisierung ist beispielhaft in Abbildung 4-9 dargestellt.

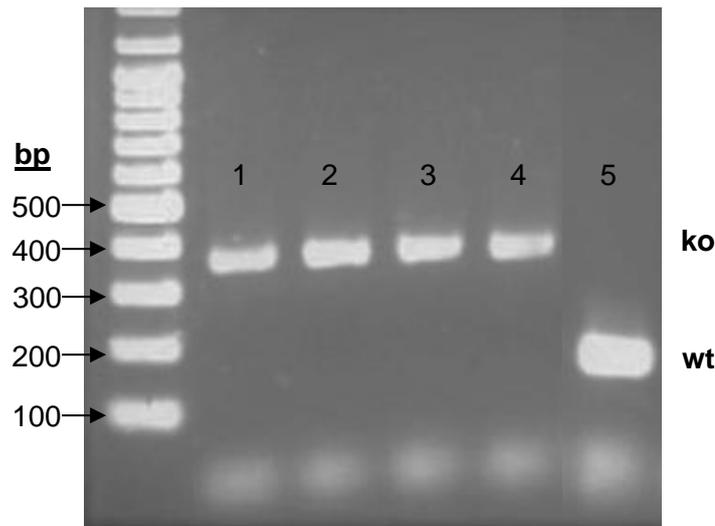


Abbildung 4-9: Ergebnisse der *Slc10a5*-Genotypisierung von Mäusen

Die gezeigten Bilder stellen repräsentative Ergebnisse der Genotypisierung von *Slc10a5*^{-/-}-Knockout-Mäusen und C57BL/6N-Mäusen dar. Bei der Genotypisierung des *Slc10a5*-Gens haben die PCR-Produkte eine Länge von 362 bp bei Knockout-Mäusen (1-4) und 180 bp bei Wildtyp-Mäusen (5).

Alle gezüchteten Tiere zeigten in der Genotypisierung den richtigen Genotyp. Um die gewünschte Anzahl an Tieren von 10 männlichen und 10 weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen sowie 10 männlichen und 10 weiblichen C57BL/6N Wildtyp-Mäusen zu erreichen, wurden die in Abbildung 4-10 zu sehenden Verpaarungen angesetzt. Die Mauslinien zeigen weder in den Wurfgrößen (Knockout MW: 6,8; Wildtyp MW: 6,8) noch in der Verteilung der Geschlechter Unterschiede. Alle Nachkommen waren überlebensfähig und zeigten keinerlei Verhaltensauffälligkeiten. Auch während der sechsmonatigen Beobachtungsphase kam es zu keinen Verhaltensauffälligkeiten der Tiere. Revierkämpfe der Mäuse blieben im normalen und tierschutzrechtlich vertretbaren Rahmen, ohne dass sich Läsionen oder haarlose Stellen zeigten.

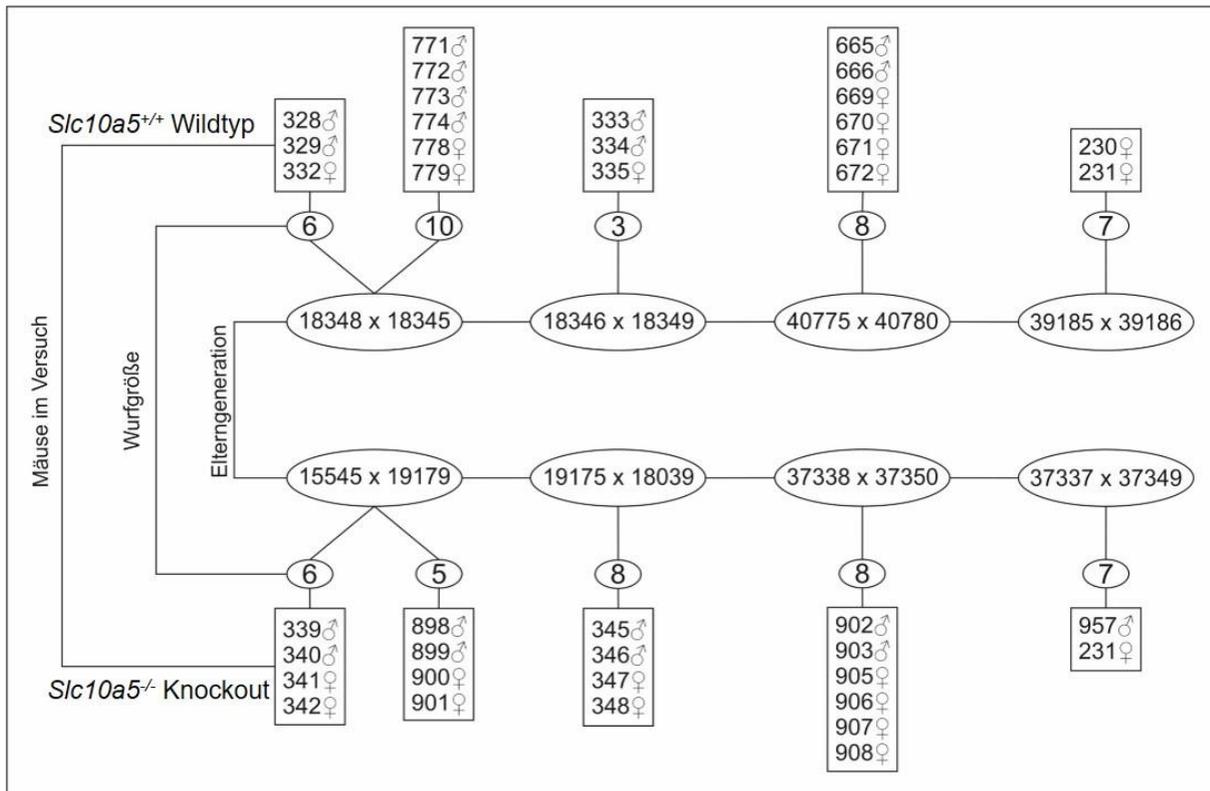


Abbildung 4-10: Schematische Darstellung der Fertilitätsdaten der für den Versuch gezüchteten *Slc10a5*^{-/-} Knockout- und C57B6N Wildtyp-Mäuse.

Die für die Daten dieser Doktorarbeit gezüchteten Mäuse stammten aus den Linien *Slc10a5*^{-/-} (Knockout) und die Wildtypiere aus der *Slc10a4*^{-/-} Knockout Linie. Alle Mäuse wurden sowohl auf ihren *Slc10a5* als auch auf ihren *Slc10a4* Gen-Status genotypisiert. Alle 40 Mäuse wurden zu je zwei Tieren gleichen Geschlechts und gleichen Genotyps in einem Käfig gehalten. Alle Käfige standen über den kompletten Zeitraum der Datenerhebung im gleichen Raum der Versuchstierhaltung.

4.5.3 Entwicklung der Mausgewichte und Futteraufnahmen

Durch ihre Unerlässlichkeit in der Fettverdauung haben Gallensäuren einen starken Einfluss auf den Energiehaushalt. Um eine mögliche Einwirkung von SLC10A5 auf den Energiehaushalt der Mäuse zu untersuchen, wurden die Körpergewichte der Tiere über den kompletten Zeitraum von sechs Monaten, mit Ausnahme der drei Wochen vor dem Absetzen, beobachtet. Zusätzlich wurde die wöchentliche Futteraufnahme durch Rückwiegen des Futters in jedem Käfig notiert, um Aussagen über Schwankungen im Appetit der Tiere machen zu können. Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Mäusen zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen. Auch die Mengen an aufgenommenem Futter zeigten bei Tieren beider Genotypen ähnliche Schwankungen und keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildung 4-11).

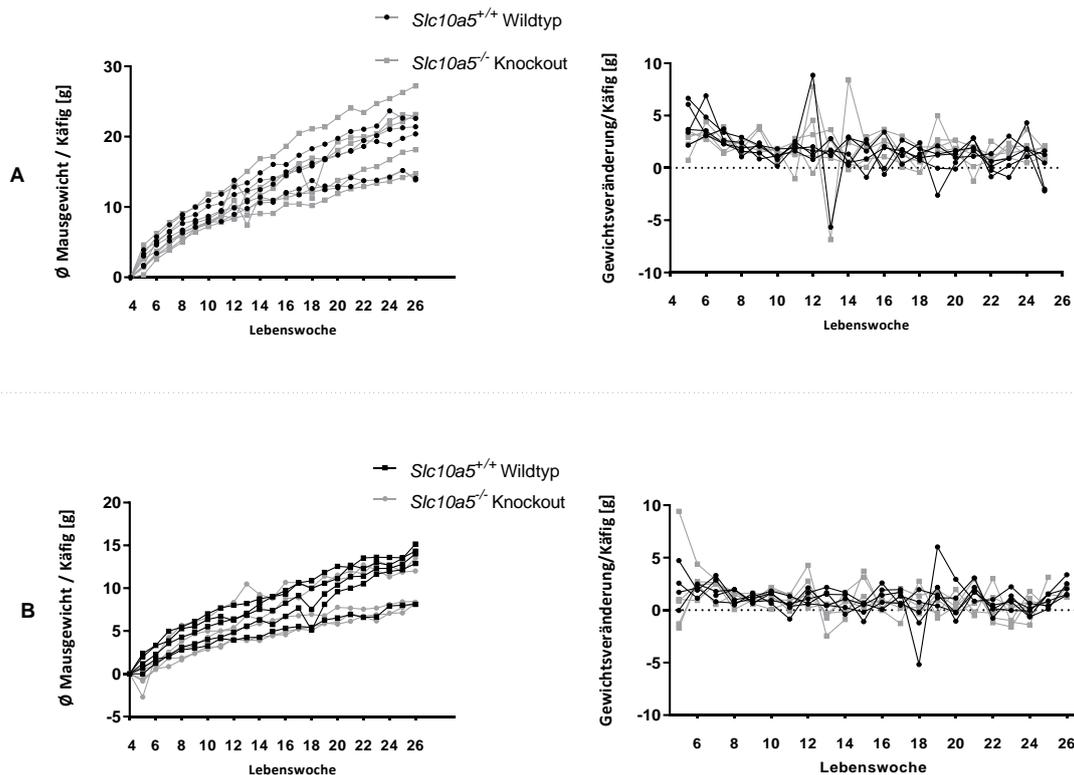


Abbildung 4-11: Gewichtsentwicklung der *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse

Die Entwicklung der Gewichte der im Versuch beobachteten *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse wurde einmal pro Woche festgestellt. Der Zeitpunkt des Wiegens war jeden Montag zwischen 9.00 Uhr und 10.00 Uhr während des Umsetzens der Mäuse in saubere Käfige. Da immer zwei Mäuse in einem Käfig saßen sind alle angegebenen Werte Mittelwerte der Mausegewichte pro Käfig. Beginn der wöchentlichen Datenerfassung war nach dem Absetzen der Jungtiere in der 5. Lebenswoche. In der oberen Reihe (A) sind die Daten der männlichen Mäuse aufgeführt, in der unteren Reihe (B) die Daten der weiblichen Mäuse. Für die Darstellung der Gewichtsentwicklung pro Käfig (linke Spalte) wurde das gemessene Gewicht beim Absetzen der Tiere von allen weiteren Gewichtsdaten subtrahiert und der Startpunkt somit auf den Wert 0 gesetzt. Absolute Gewichtsdaten sind daher nicht direkt ablesbar.

4.5.4 Untersuchung der Kotproben

Neben der Futteraufnahme und der Gewichtsentwicklung gibt auch die Menge und Beschaffenheit des Mäusekots Informationen über Verschiebungen im Gallensäurestoffwechsel. Vor allem Veränderungen der mikrobiellen Darmflora kommen hier zum Tragen. Der Kot einer Woche wurde einmal im Monat aus den Käfigen gesammelt und gefriergetrocknet. Dadurch wurde der Einfluss der im Kot enthaltenen Wassermenge minimiert und Trockenmassen konnten verglichen werden. Alle gezeigten Werte waren Annäherungen, da sowohl die Kotmenge, als auch die mittleren Wochengewichte nicht pro Maus, sondern nur pro Käfig (mit je 2 Mäusen) berechnet werden konnten. Bei einer geschlechterspezifischen Betrachtung der Kotmengen aller Sammelzeitpunkte zeigte sich bei den männlichen Mäusen

kein signifikanter Unterschied zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen. Bei den weiblichen Tieren waren die Kotmengen der Knockout-Mäuse signifikant höher als die der Wildtyp-Tiere (Abbildung 4-12).

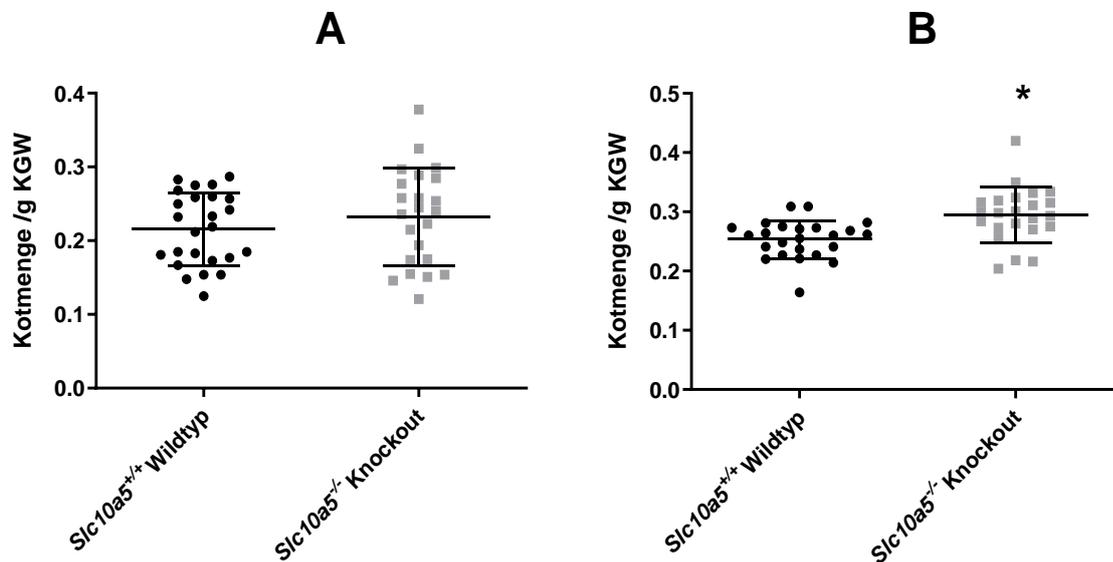


Abbildung 4-12: Vergleich der Kotmengen von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Einmal pro Monat wurde der Kot einer gesamten Woche aus jedem Käfig gesammelt und gefriergetrocknet. Gezeigt sind die Trockenmassen der Kotproben aller Sammelzeitpunkte, aufgetrennt nach Geschlecht und Genotyp. Alle Werte wurden unter Verwendung des Mittelwertes der Anfangs- und Endgewicht der Mäuse der jeweiligen Woche normiert. Gezeigt sind die auf die jeweiligen durchschnittlichen Körpergewichte pro Käfig normierten Kotmengen der männlichen (A) und weiblichen (B) *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse. Die statistische Berechnung der im Streudiagramm aufgetragenen Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte durch einen t-Test innerhalb der Geschlechtergruppen (* p<0,05). Die Anzahl der Mäuse in den Gruppen betrug: *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp männlich (n=25); weiblich (n=24) und *Slc10a5*^{-/-} Knockout männlich (n=23); weiblich (n=23).

4.5.5 Energiebilanz

Eine weitere Möglichkeit, wie sich Verschiebungen in der Verdauung zeigen können, ist eine Veränderung der aufgenommenen Energie bzw. der Energie, die durch den Kot verloren geht. Um diese Energie zu bilanzieren, wurden sowohl das Futter als auch die Kotproben kalorimetrisch untersucht. Als Kennzahl wurde die verdauliche Energie berechnet. Dabei handelt es sich um die Menge an Energie, welche dem Körper effektiv zur Verfügung steht. Bei den verdaulichen Energien zeigten sich weder bei den männlichen noch den weiblichen Mäusen signifikante Unterschiede zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen (Abbildung 4-13).

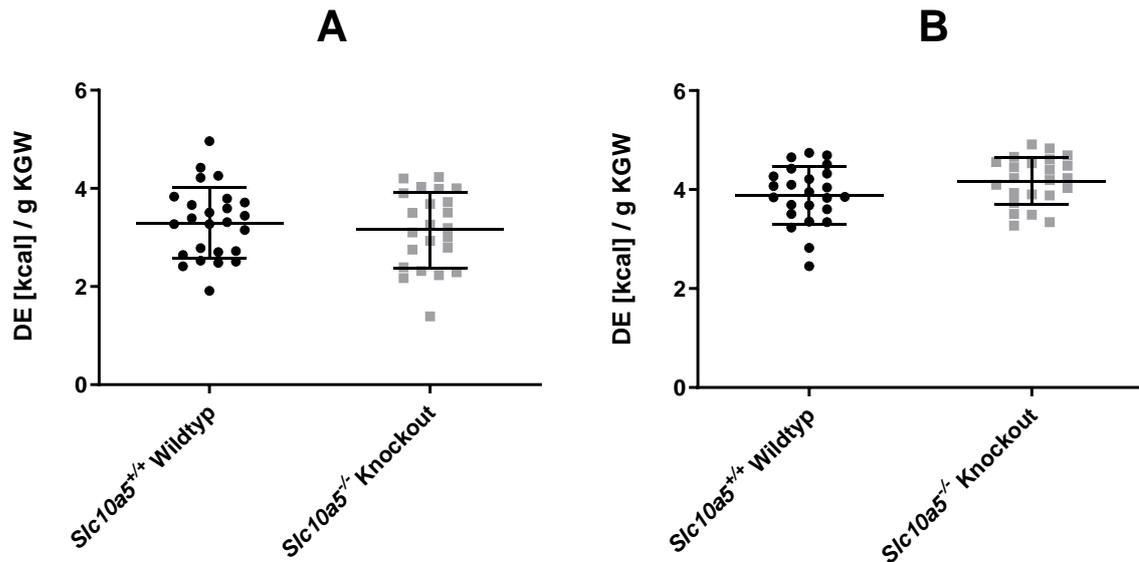
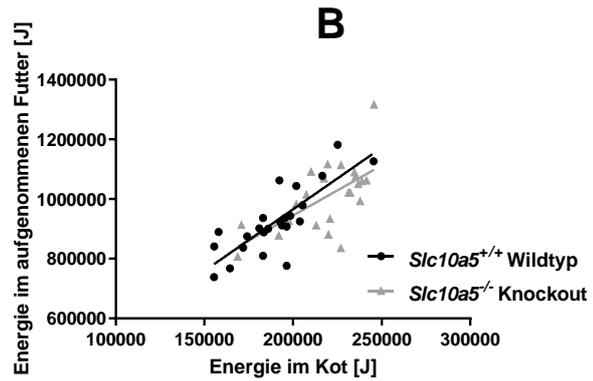
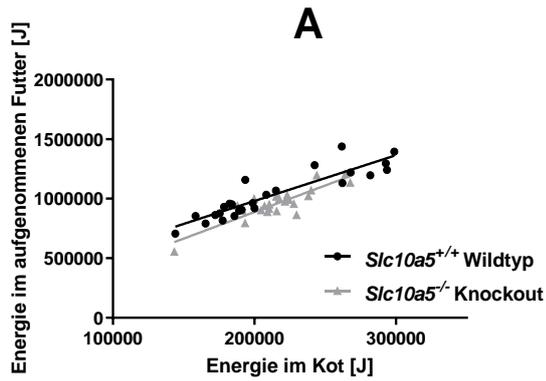


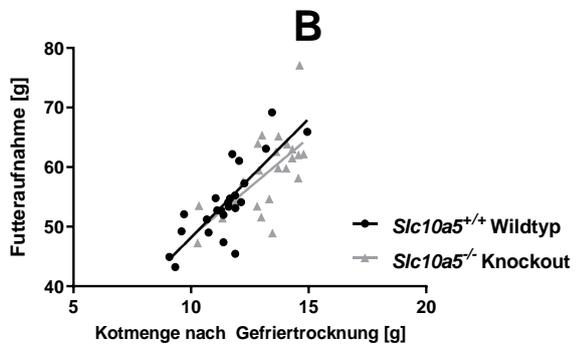
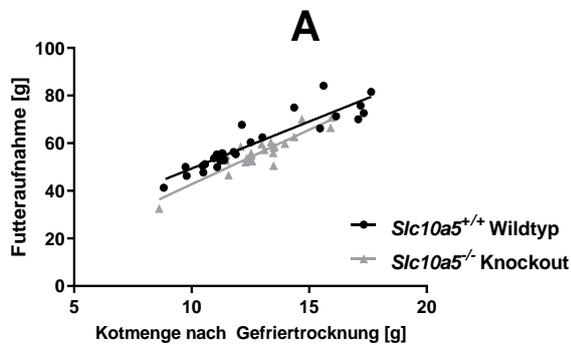
Abbildung 4-13: Vergleich der Verdaulichen Energien von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Die Verdauliche Energie (DE) wurde berechnet, indem die im gefriergetrockneten Kot gemessene Energie von der im Futter gemessenen Energie abgezogen wurde. Alle Werte wurden von Joule in Kilokalorien (kcal) umgerechnet. Das zur Normierung der Werte verwendete Körpergewicht ist der Mittelwert der Anfangs- und Endgewichte der Woche, in der der Kot aus den Käfigen gesammelt wurde. Gezeigt sind die Messdaten aus der Bombenkalorimetrie für die Kot- und Futterproben der männlichen (A) und weiblichen (B) *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse. Die statistische Berechnung der im Streudiagramm aufgetragenen Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte durch einen t-Test innerhalb der Geschlechtergruppen ($p < 0,05$). Die Anzahl der Mäuse in den Gruppen betrug: *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Mäuse männlich $n=25$; weiblich $n=24$ und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse männlich $n=23$; weiblich $n=23$.

Die dargestellten Daten zu Kotmengen und verdaulichen Energien der Mäuse sind durch das Zusammenfügen von unterschiedlichen Messpunkten unterschiedlicher Alterszeitpunkte der Mäuse Annäherungswerte. Gemeinsam mit dem Wachstum der Mäuse nahmen auch die aufgenommenen Futtermengen und damit einhergehenden Kotmengen zu. Um diese Abhängigkeiten der einzelnen Zeitpunkte zwischen den Datensätzen darzustellen, wurden Korrelationen zur Energie im Futter und Energie im Kot sowie Futteraufnahme und Kotabsatz berechnet (Abbildung 4-14). Die Berechnungen zeigten, dass vor allem bei den männlichen Mäusen die jeweiligen Parameter stark korrelierten. Diese Korrelation war bei den weiblichen Mäusen etwas geringer. Bei den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Weibchen zeigten sich die größten Streuungen und geringsten Abhängigkeiten der Werte sowohl bei den Energiedaten als auch bei den Futter- und Kotmengen. Der Vergleich zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen erfolgte über einen Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden beider Gruppen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in den Entwicklungen der Energieverwertung oder Futtermenge festgestellt werden.



	Energie im Futter vs. Energie im Kot	Geschlecht	Korrelation			Lineare Regression		
			Datensätze	Pearson r	R ²	Signifikanz	Steigung	Unterschiede der Steigungen
A	<i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp	männlich	n=25	0,9064	0,8215	ja; p<0,0001	3,843±0,3735	n.s.
	<i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout	männlich	n=23	0,8701	0,7571	ja; p<0,0001	4,457±0,5509	n.s.
B	<i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp	weiblich	n=24	0,802	0,6431	ja; p<0,0001	4,127±0,6555	n.s.
	<i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout	weiblich	n=23	0,6249	0,3905	ja; p<0,0014	3,352±0,9137	n.s.



	Futteraufnahme vs. Kotmenge	Geschlecht	Korrelation			lineare Regression		
			Datensätze	Pearson r	R ²	Signifikanz	Steigung	Unterschiede der Steigungen
A	<i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp	männlich	n=25	0,9188	0,8442	ja; p<0,0001	3,946±0,3534	n.s.
	<i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout	männlich	n=23	0,9011	0,8119	ja; p<0,0001	4,574±0,4804	n.s.
B	<i>Slc10a5</i> ^{+/+} Wildtyp	weiblich	n=24	0,8033	0,6452	ja; p<0,0001	3,981±0,6294	n.s.
	<i>Slc10a5</i> ^{-/-} Knockout	weiblich	n=23	0,6425	0,4128	ja; p=0,0009	3,316±0,8631	n.s.

Abbildung 4-14: Energie- und Futterbilanz von männlichen und weiblichen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen.

Sowohl die Energiedaten aus dem aufgenommenen Futter der Mäuse und der im Kot verbliebenen Energie (**A+B**) als auch die reine Menge an aufgenommenem Futter und abgegebenem Kot (**C+D**) wurden jeweils auf ihre Abhängigkeit hin untersucht und verglichen. Zur statistischen Auswertung wurden der Pearson-Koeffizient (*r*) und der zugehörige *R*²-Wert, sowie die lineare Regression der Daten, angegeben als Steigung der Regressionsgeraden, berechnet. Die Daten von männlichen (**A+C**) und weiblichen (**B+D**) Mäusen wurden getrennt betrachtet. In den Tabellen unter den Diagrammen sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung zu sehen. Der mathematische Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen erfolgte durch einen t-Test (*p*<0,05).

4.5.6 Finale Organentnahme

In der 25. Lebenswoche wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet. Keine der Mäuse zeigte zu diesem Zeitpunkt Auffälligkeiten im Verhalten oder dem äußeren Erscheinungsbild. Wie in Abbildung 4-15 zu sehen, waren keine pathologischen Veränderungen nach dem Eröffnen des Bauch- und Brustraums zu sehen. Die Gallenflüssigkeit hatte bei allen Mäusen eine gelbliche Farbe. Vor allem das Darmkonvolut und die Leber wurden genauer auf optische Veränderungen untersucht. Diese traten jedoch bei keiner der Mäuse auf.

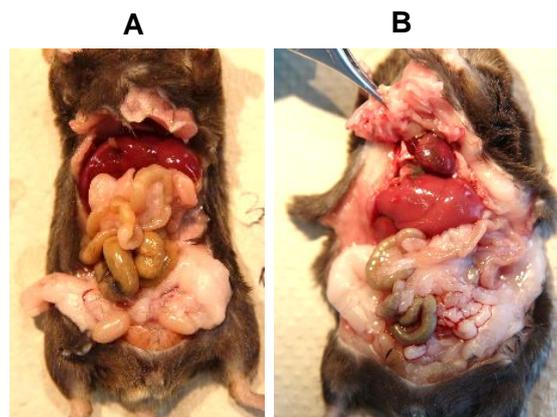


Abbildung 4-15: Bauchsitus von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Nach 6 Monaten wurden alle Mäuse nach Eröffnung des Bauch- und Brustraums vor der Entnahme der Proben und Organe auf Abweichungen von der normalen Anatomie untersucht. Gezeigt sind repräsentativ zwei Mäuse für die gesamte Gruppe. Unter **A** eine *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Maus, unter **B** eine *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus zu sehen.

Zusätzlich zur makroskopischen Untersuchung der Organe wurden Lebern, Nieren und Dickdarm histologisch untersucht. In Abbildung 4-16 sind repräsentativ die Bilder für *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse gegenübergestellt. In keinem der angefertigten histologischen Schnitte unterschiedlicher Mäuse konnten pathologische Veränderungen festgestellt werden.

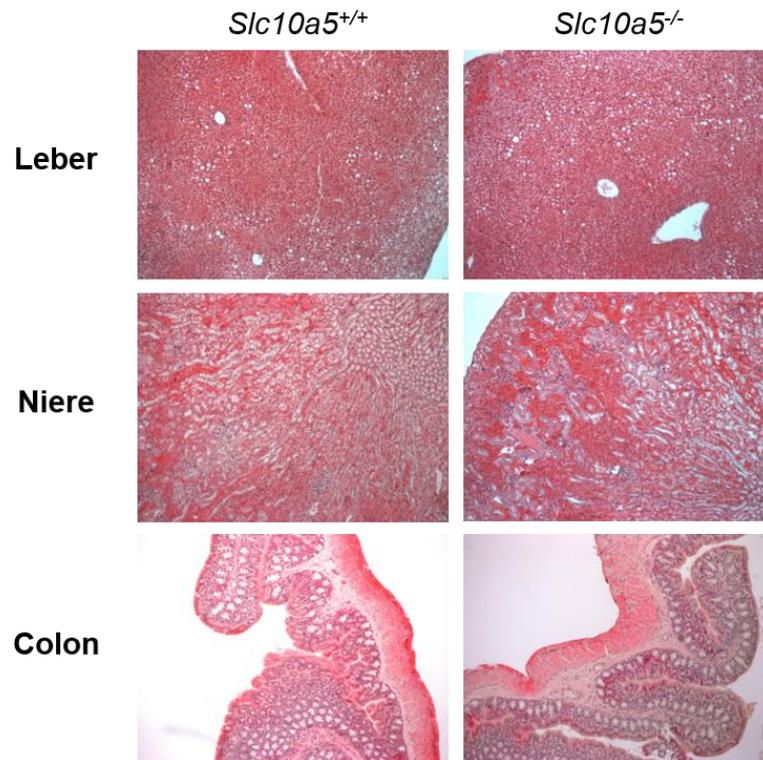


Abbildung 4-16: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mausgewebe

Gewebeschnitte der Leber, Nieren und des Colons von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen wurden nach Entnahme immersionsfixiert in Bouin-Lösung, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Gewebeblöcke am Mikrotom geschnitten und im Färbeautomaten Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Gezeigt ist eine 100-fache Vergrößerung.

4.5.7 Genexpression ausgewählter Gene

Um zu untersuchen, ob bestimmte Gene in der *Slc10a5*^{-/-} Knockout Maus anders reguliert werden als in *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Tieren, wurden zehn Gene ausgewählt und mittels quantitativer *real-time PCR* analysiert. Bei den männlichen Tieren trat bei keinem der untersuchten Gene ein signifikanter Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen auf. Bei den weiblichen Mäusen waren die Gene *Abcb11*, *Cyp7b1* und *Nr1h4* in den Knockout-Mäusen stärker exprimiert als in den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 4-17).

Betrachtet man die gezeigten Daten der Genexpressionsanalyse als relative Expressionsdaten in Bezug auf die jeweilige *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Kontrollgruppe, so zeigt sich, dass sich die meisten Abweichungen im Bereich einer 2-fach Erhöhung oder Verringerung der Genexpression befinden (Abbildung 4-17). Die höchsten Werte wurden bei den Genen *Abcb11*, *Cyp7a1*, *Cyp7b1* und *Nr1h4* im Bereich einer 1,5 bis 2-fachen Veränderung der Genexpression erzielt. Für *Bsep*, *Cyp7b1* und *Nr1h4* zeigen sich auch hier optisch die Unterschiede, die in der vorangegangenen Abbildung (Abbildung 4-17) statistisch signifikant unterschiedlich waren.

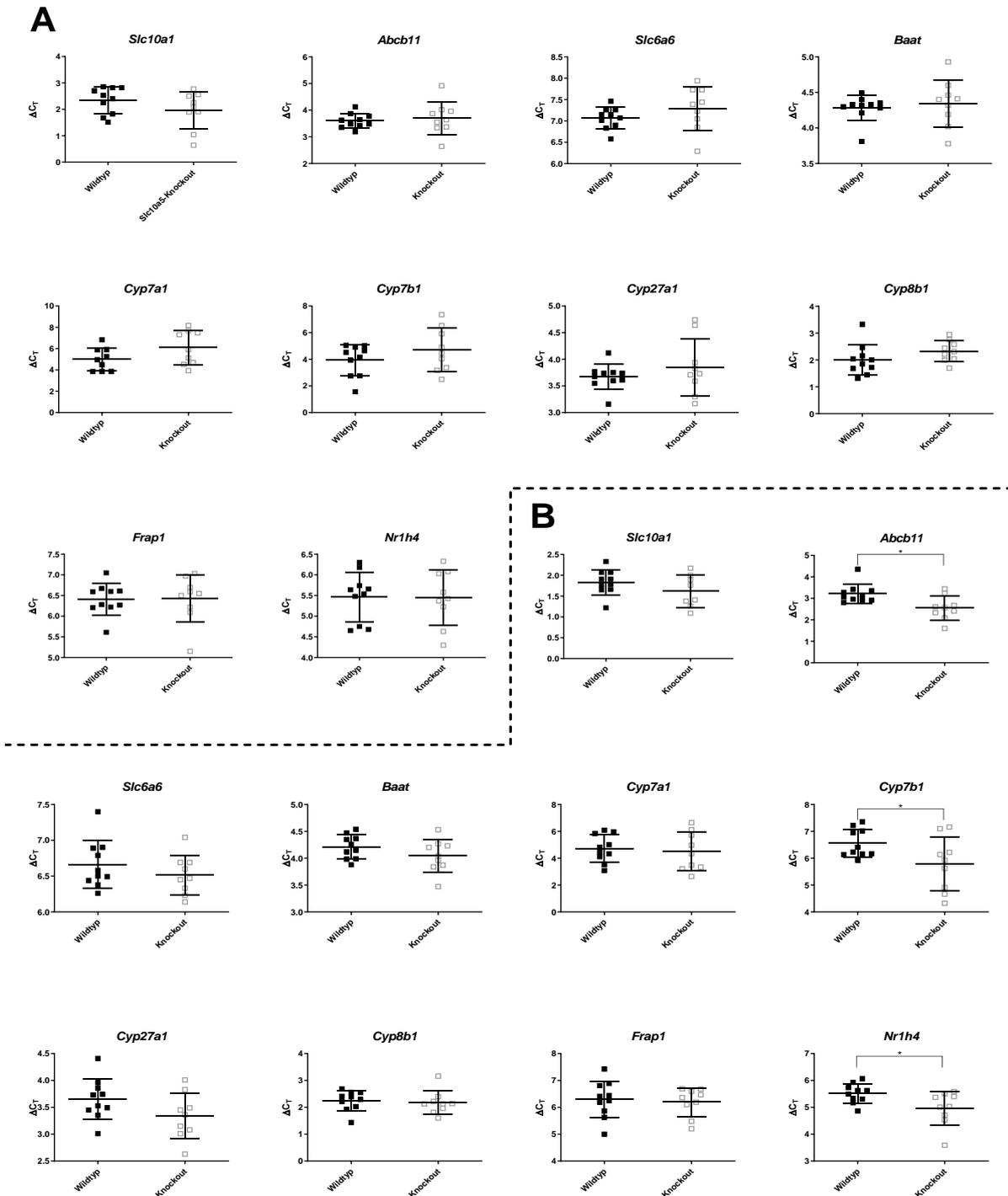


Abbildung 4-17: Genexpression in der Leber von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout Mäusen

Zehn Gene wurden mittels quantitativer *real-time PCR* auf ihre Expression im Lebergewebe der unter Standardfütterung gehaltenen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout Mäusen untersucht. Unter **A** finden sich die Expressionsdaten für die männlichen Mäuse, unter **B** die der weiblichen. Für die PCR wurden 25 ng cDNA eingesetzt und die Berechnung der ΔC_T -Werte erfolgte mit dem *housekeeping*-Gen GAPDH als Referenzgen. Aufgetragen sind die einzelnen Werte (Wildtyp männlich, n=10; Wildtyp weiblich, n=10; Knockout männlich, n=9; Knockout weiblich, n=9), sowie Mittelwert und Standardabweichung im Streudiagramm. Zur statistischen Berechnung wurde auf Grund teilweise unterschiedlicher Standardabweichungen ein unpaariger t-Test mit Welch's-Modifikation durchgeführt (* $p < 0,05$).

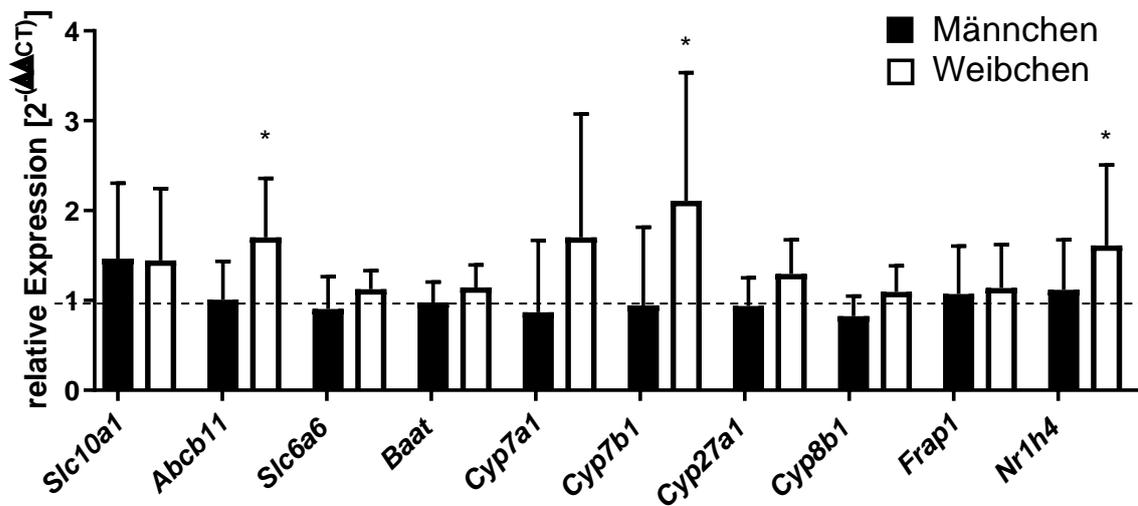


Abbildung 4-18: Relative Genexpression im Lebergewebe der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Die relative Expression der untersuchten Gene wurde für männliche und weibliche *Slc10a5*^{-/-} Knockout Mäuse in Bezug auf die Wildtyp-Kontrollen dargestellt. Die ΔC_T Werte beider Gruppen wurden mit dem *housekeeping*-Gen GAPDH als Referenzgen errechnet. Der Mittelwert der ΔC_T -Werte der Wildtyp-Tiere wurden als interne Kalibrator von den ΔC_T Werten der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Tiere subtrahiert und so der $\Delta\Delta C_T$ -Wert generiert. Dargestellt sind die durch $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Transformation ermittelten Mittelwerte mit RQ_{min} und RQ_{max} der relativen Genexpression (Männchen, n=9; Weibchen, n=9). Die Daten der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere wurden durch einen t-test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Diese Unterschiede traten bei weiblichen Tieren bei den Genen *Abcb11*, *Cyp7b1* und *Nr1h4* auf (*p<0,05).

4.6 Massenspektrometrische Gallensäureanalyse

In einem vorangegangenen Fütterungsexperiment am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin in Gießen wurde über die Fütterung von Cholat ein Phänotyp bei der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus induziert (Aretz, 2015). Die Mäuse zeigten dabei ein massives Taurin-Konjugationsdefizit und eine signifikant erhöhte Menge an unkonjugierten Gallensäuren. Dies konnte auch durch die gestiegene Glycin-Konjugation der Gallensäuren nicht kompensiert werden. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung der Gallensäureprofile der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse sollte geklärt werden, ob der unter Überladung des enterohepatischen Kreislaufs auftretende Phänotyp auch bei Mäusen unter Standardfütterungsbedingungen im Detail zu finden ist. Mittels Massenspektrometrie wurden dazu Proben von Portalblut, Gallenflüssigkeit, Kot aus dem Enddarm und peripheres Blut analysiert und deren Gallensäureprofile ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte ausschließlich zwischen den Gruppen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp und *Slc10a5*^{-/-} Knockout innerhalb der Geschlechter. Auf den zusätzlichen Vergleich zwischen den Geschlechtern wurde auf Grund der starken Unterschiede im Gallensäurestoffwechsel von männlichen und weiblichen Mäusen verzichtet. Eine detaillierte Begründung ist in Kapitel 5.3.8 zu finden.

4.6.1 Gallensäurekonzentrationen im Portalblut

Nach ihrer Ausscheidung in den Dünndarm gelangen Gallensäuren durch Reabsorptionsprozesse im Ileum und dem Dickdarm in das Portalblut und werden zur Leber transportiert. Die Mäuse hatten bis zum Zeitpunkt der Probennahme Futter und Wasser zur freien Verfügung. Bei 10 der 40 Mäuse konnte kein Portalblut in ausreichender Menge gewonnen werden, da das Blut entweder schon begonnen hatte zu gerinnen oder die Pfortader erschlafft und daher nicht mehr punktierbar war. In Tabelle 4-3 sind alle gemessenen Gallensäurekonzentrationen aufgeführt. Die höchsten Konzentrationen im Portalblut in allen Mausgruppen wurden für Taurocholat gemessen, gefolgt von den Isoformen der Muricholsäure und deren unkonjugierten Formen. Glycin-Konjugate der Gallensäuren waren entweder nicht detektierbar oder in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Alle gemessenen Werte wiesen hohe biologische Streuungen unabhängig von Geschlecht und Genotyp auf. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 4-3: Gallensäurekonzentrationen im Portalblut von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Aufgelistet sind die im Serum des Portalbluts gemessenen Gallensäurekonzentrationen in $\mu\text{mol/L}$. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Taurin-konjugierten, Glycin-konjugierten und unkonjugierten Formen der Gallensäuren bei männlichen und weiblichen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen. Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen: *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp männlich, n=8; weiblich, n=4, *Slc10a5*^{-/-} Knockout männlich, n=8; weiblich, n=10.

	<i>Slc10a5</i> ^{+/+}				<i>Slc10a5</i> ^{-/-}			
	männlich		weiblich		männlich		weiblich	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Taurin-Konjugate								
T- ω -MCA	3,955	3,249	2,053	1,916	3,261	3,241	6,937	12,182
T- α -MCA	2,639	3,348	4,180	3,789	2,570	2,988	6,570	12,043
T- β -MCA	7,480	8,403	8,368	5,356	5,616	4,337	17,841	30,844
THCA	0,030	0,035	0,048	0,045	0,143	0,178	0,211	0,411
TCA	29,150	37,757	27,300	19,196	38,185	43,621	60,102	100,034
TMDCA	0,224	0,201	0,460	0,438	0,386	0,412	0,970	1,613
TUDCA	0,774	0,982	1,193	0,559	0,545	0,533	2,877	4,890
THDCA	0,289	0,186	0,330	0,380	0,395	0,399	0,764	1,337
TCDCA	1,203	1,119	1,703	1,499	1,241	1,201	3,043	5,165
TDCA	0,968	0,839	3,098	2,554	1,408	1,564	4,281	7,018
TLCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glycin-Konjugate								
G- ω -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G- α -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G- β -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GHCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GCA	0,076	0,079	0,090	0,049	0,073	0,043	0,113	0,144
GUDCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GHDCA	0,009	0,003	0,005	0,005	0,010	0,005	0,006	0,005
GCDCA	0,010	0,007	0,013	0,004	0,013	0,004	0,013	0,008
GDCA	0,013	0,008	0,013	0,011	0,011	0,003	0,008	0,006
GLCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unkonjugiert								
ω -MCA	4,129	4,789	4,038	4,363	2,631	1,580	3,402	3,763
α -MCA	0,605	0,603	1,373	1,483	0,714	0,386	0,924	1,289
β -MCA	2,755	3,300	5,153	6,531	1,386	1,094	1,804	1,840
HCA	0,008	0,020	n.d.	n.d.	0,055	0,078	0,032	0,049
CA	2,304	1,813	8,590	13,414	4,910	4,653	2,991	4,062
DHCA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
MDCA	0,041	0,047	0,180	0,249	0,088	0,064	0,090	0,094
UDCA	0,373	0,406	1,293	1,951	0,298	0,216	0,492	0,530
HDCA	0,250	0,260	0,550	0,804	0,429	0,227	0,344	0,429
CDCA	0,113	0,117	0,355	0,558	0,030	0,069	0,125	0,172
DCA	1,264	1,747	3,193	3,052	4,459	2,034	2,265	2,589
LCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

4.6.2 Gallensäurekonzentrationen in der Gallenflüssigkeit

Über das Portalblut gelangen die Gallensäuren zur Leber, wo sie von unterschiedlichen Transportsystemen aufgenommen und in Hepatozyten weiter prozessiert werden. Gemeinsam mit den neu synthetisierten Gallensäuren werden sie danach in die Gallenkanälchen abgegeben, um aus der Gallenblase wieder in den Darm abgegeben werden zu können. Die Gallenflüssigkeit wurde durch Punktion komplett aus der Gallenblase gewonnen und anschließend analysiert. Bei 5 der 40 Mäuse war die Gallenblase leer und es konnte keine Gallenflüssigkeit entnommen werden. In Tabelle 4-4 sind alle gemessenen Konzentrationen der Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit aufgeführt. Die Galle bestand fast ausschließlich aus Taurin-konjugierten Gallensäuren. Auch hier war Taurocholat gefolgt von den Isoformen der Muricholsäure in den höchsten Konzentrationen vertreten. Die unkonjugierten Formen, am stärksten vertreten durch Cholat und Muricholsäure, wiesen hohe Standardabweichungen auf. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich bei den Konzentrationen von Taurohyocholsäure und Taurodeoxycholsäure der männlichen *Slc10a5^{+/+}* Wildtyp- und *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäuse, wobei die Konzentrationen dieser Gallensäuren bei den Knockout-Mäusen höher waren.

Tabelle 4-4: Gallensäurekonzentrationen in der Gallenflüssigkeit von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Aufgelistet sind die in der Gallenflüssigkeit gemessenen Konzentrationen der Gallensäuren in $\mu\text{mol/L}$. Nicht detektierte Gallensäuren sind mit n.d. gekennzeichnet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Taurin-konjugierten, Glycin-konjugierten und unkonjugierten Formen der Gallensäuren bei männlichen und weiblichen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen. Anzahl an Tieren in den einzelnen Gruppen: *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp männlich n=8, weiblich n=9, *Slc10a5*^{-/-} Knockout männlich n=9, weiblich n=9. Statistische Unterschiede wurden innerhalb der Geschlechter zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen durch einen individuellen t-Test für jede Gallensäure berechnet. Werte, die sich signifikant unterscheiden, wurden **hervorgehoben** ($p < 0,05$).

	<i>Slc10a5</i> ^{+/+}				<i>Slc10a5</i> ^{-/-}			
	männlich		weiblich		männlich		weiblich	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Taurin-Konjugate								
T- ω -MCA	3312,0	1616,9	2404,5	901,4	3050,6	745,0	2556,7	649,8
T- α -MCA	2658,0	801,7	3498,9	2892,7	3099,2	867,7	2904,8	621,6
T- β -MCA	7613,9	3602,6	6695,9	3176,8	6073,2	2721,3	6566,1	1302,6
THCA	56,7*	29,7	94,6	47,1	145,4*	48,7	109,9	28,8
TCA	17898,0	5334,1	16981,1	5849,4	25046,6	8791,9	19414,9	3197,4
TMDCA	369,3	418,3	769,2	620,4	534,1	217,7	543,4	162,6
TUDCA	1147,7	294,4	2151,1	898,4	1079,2	270,4	1717,0	480,5
THDCA	292,9	150,6	284,7	143,4	493,8	142,0	438,5	120,1
TCDCa	924,7	219,5	1214,7	548,7	1143,6	231,9	1249,3	470,3
TDCA	771,6*	257,0	2269,4	655,2	1689,2*	562,5	2057,1	593,5
TLCA	3,5	1,5	10,7	5,8	8,0	4,2	10,4	4,8
Glycin-Konjugate								
G- ω -MCA	2,0	1,3	0,8	0,4	1,3	0,7	1,3	0,4
G- α -MCA	1,8	0,9	1,3	0,7	1,6	0,6	1,4	0,9
G- β -MCA	9,2	8,6	5,5	3,6	3,2	2,1	5,7	2,5
GHCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GCA	36,2	15,2	29,2	9,7	31,7	9,4	30,0	11,0
GUDCA	0,7	0,3	1,0	0,5	0,5	0,1	0,9	0,4
GHDCa	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1
GCDCA	0,8	0,3	0,7	0,3	0,7	0,1	0,7	0,5
GDCA	0,2	0,1	0,5	0,2	0,4	0,2	0,5	0,2
GLCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unkonjugiert								
ω -MCA	48,9	63,9	38,6	28,3	19,6	12,0	42,4	29,0
α -MCA	9,2	8,2	15,7	9,1	4,6	1,9	11,9	9,3
β -MCA	32,5	45,9	26,0	23,9	8,0	5,8	16,7	18,3
HCA	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,2	0,6	0,3
CA	53,6	62,7	75,1	77,7	34,7	24,3	59,8	53,0
DHCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MDCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
UDCA	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
HDCA	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
CDCA	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1
DCA	0,4	0,4	0,3	0,2	0,7	1,2	0,3	0,1
LCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

4.6.3 Gallensäurekonzentrationen im Kot

Gallensäuren, die während der Darmpassage nicht rückresorbiert werden können, werden über den Kot aus dem Körper ausgeschieden. Die Kotproben für die Gallensäureanalytik wurden direkt aus dem Enddarm der Mäuse entnommen. Die Gallensäuren wurden aus dem Kot extrahiert und im Massenspektrometer analysiert. Kotproben konnten aus 38 der 40 Mäuse in ausreichender Menge gewonnen werden. Tabelle 4-5 zeigt die gemessenen Konzentrationen der Gallensäuren im Kot der Mäuse. Insgesamt war die Konzentration aller Gallensäuren im Kot (pmol/mg) im Vergleich zu den Konzentrationen in der Galle ($\mu\text{mol/L}$) sehr gering. Glycin-konjugierte Gallensäuren wurden dabei fast gar nicht über den Kot ausgeschieden. Auch bei den Taurin-Konjugaten waren Ausscheidungsmengen im niedrigen picomolaren Bereich. Die unkonjugierten Gallensäuren zeigten die höchsten Konzentrationen im Kot der Mäuse. Hier waren ω -Muricholsäure und Deoxycholsäure am stärksten vertreten gefolgt von den anderen Isoformen der Muricholsäure und Cholsäure. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen traten bei den Gallensäuren Hyodeoxycholsäure und Deoxycholsäure in der männlichen Mausgruppe auf. In beiden Fällen waren höhere Konzentrationen der beiden Gallensäuren im Kot der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse zu finden.

Tabelle 4-5: Gallensäurekonzentrationen in Kotproben von *Slc10a5^{+/+}* Wildtyp- und *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen

Aufgelistet sind die Konzentrationen der Gallensäuren (in **pmol/mg**) in den Kotproben aus dem Enddarm. Nicht detektierte Gallensäuren sind mit n.d. gekennzeichnet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Taurin-konjugierten, Glycin-konjugierten und unkonjugierten Formen der Gallensäuren bei männlichen und weiblichen *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen und *Slc10a5^{+/+}* Wildtyp Mäusen. Die Anzahl an Tieren in den einzelnen Gruppen ist: *Slc10a5^{+/+}* Wildtyp männlich n=10, Wildtyp weiblich n=9, *Slc10a5^{-/-}* Knockout männlich n=9, Knockout weiblich n=10. Statistische unterschiede wurden zwischen *Slc10a5^{-/-}* Knockout- und *Slc10a5^{+/+}* Wildtyp-Mäusen durch einen individuellen t-test für jede Gallensäure berechnet. Werte, die sich statistisch signifikant unterscheiden, wurden **hervorgehoben** (*p<0,05).

	<i>Slc10a5^{+/+}</i>				<i>Slc10a5^{-/-}</i>			
	männlich		weiblich		männlich		weiblich	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Taurin-Konjugate								
T- ω -MCA	3,53	3,42	2,94	2,71	5,04	7,16	4,33	4,57
T- α -MCA	0,89	1,00	2,12	2,18	2,69	4,69	2,22	3,34
T- β -MCA	4,28	3,30	4,30	3,67	7,52	11,09	6,83	7,88
THCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TCA	9,72	4,74	15,67	8,68	21,17	16,15	10,99	6,17
TMDCA	0,20	0,17	0,14	0,14	0,24	0,21	0,52	0,51
TUDCA	0,21	0,08	0,53	0,39	0,37	0,20	0,60	0,42
THDCA	0,21	0,17	0,21	0,13	0,49	0,48	0,43	0,36
TCDCA	0,36	0,13	0,49	0,38	0,84	0,71	0,95	0,70
TDCA	0,40	0,33	2,22	2,51	1,18	0,94	2,21	2,06
TLCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glycin-Konjugate								
G- ω -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G- α -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G- β -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GHCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GCA	0,28	0,27	0,48	0,49	0,38	0,35	0,22	0,22
GUDCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GHDCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GCDCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GDCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GLCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unkonjugiert								
ω -MCA	749,95	352,40	1507,03	756,73	571,30	274,20	1060,83	164,09
α -MCA	120,33	53,92	436,23	247,10	123,58	70,36	361,41	108,58
β -MCA	106,12	79,74	363,70	237,05	50,10	51,24	155,78	99,83
HCA	14,34	6,52	43,66	36,40	22,14	10,28	41,43	13,18
CA	124,42	121,74	363,28	434,20	76,02	45,21	116,50	128,34
DHCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MDCA	3,27	1,48	14,59	17,45	4,27	1,91	14,29	7,10
UDCA	5,22	3,11	23,95	19,99	5,74	2,23	12,00	5,70
HDCA	18,22*	8,14	43,83	30,31	38,94*	10,38	79,65	28,61
CDCA	0,96	0,87	7,92	6,90	0,61	1,36	2,35	3,12
DCA	153,63*	97,69	588,38	374,93	364,10*	97,05	464,16	102,19
LCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

4.6.4 Gallensäurekonzentrationen im Blut des Körperkreislaufs

Ein geringer Anteil an Gallensäuren, der über das Portalblut durch die Leber fließt, gelangt selbst unter physiologischen Bedingungen nicht in die Hepatozyten. Diese Gallensäuren lassen sich im Blut des Körperkreislaufs messen. Ausreichend große Mengen Blut konnten bei 37 von 40 Mäusen gewonnen werden. Das Serum wurde durch Zentrifugation von den zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt und massenspektrometrisch analysiert. In Tabelle 4-6 sind die gemessenen Gallensäurekonzentrationen dargestellt. Insgesamt waren die Konzentrationen aller im peripheren Blut gemessenen Gallensäuren geringer als im Portalblut oder der Gallenflüssigkeit. Die höchste Konzentration hatte Taurocholsäure bei beiden Geschlechtern und Genotypen, gefolgt von den Isoformen der Tauro-Muricholsäure. In der Gruppe der unkonjugierten Gallensäuren war Cholat am stärksten vertreten gefolgt von Muricholsäure, Cholsäure und Deoxycholsäure. Der Unterschied der Konzentrationen von Deoxycholsäure war bei den männlichen Mäusen statistisch signifikant mit einer höheren Konzentration bei den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Tieren.

Das Blut des Körperkreislaufs stellt den konstantesten Gallensäuremesspunkt dar und ist unabhängiger von Fütterungszeitpunkten als z.B. das Portalblut oder die Gallenflüssigkeit. Deshalb ist hier eine Betrachtung aus verschiedenen Blickwinkeln besonders wichtig. Dazu wurden, wie in Abbildung 4-19 zu sehen, die relativen Anteile der Taurin- und unkonjugierten Gallensäuren dargestellt. Hier zeigte sich, genau wie bei den absoluten Daten aus Tabelle 4-6, dass Unterschiede ausschließlich bei den männlichen Tieren auftraten. Bei den Taurin-konjugierten Gallensäuren war der Anteil von Taurodeoxycholsäure und Taurocholsäure in den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen höher als in den Wildtyp Tieren. Dem entgegen stand die relative Abnahme des Muricholsäure-Anteils in den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Tieren. Dieser Effekt zeigte sich bei den unkonjugierten Gallensäuren noch stärker. Hatten die Muricholsäuren in den Wildtyp-Mäusen einen Anteil von mehr als 50%, so sank dieser in den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen auf etwa 35%. Diese Verschiebung wurde vor allem von Deoxycholsäure mit einem Unterschied von 12% in den Wildtyp-Mäusen zu 28% in den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen begleitet. Verglich man diese Verschiebung mit den absoluten Gallensäurekonzentrationen wurde klar, dass die Unterschiede der Deoxycholsäure-Menge ursächlich waren für die Verschiebung der Anteile, da diese eine statistische Signifikanz aufwiesen, wohingegen die Abnahme der Muricholsäure-Konzentrationen lediglich tendenziell zu beobachten ist.

Tabelle 4-6: Gallensäurekonzentrationen im peripheren Blut von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Aufgelistet sind die Konzentrationen der Gallensäuren im Blut des Körperkreislaufs in $\mu\text{mol/L}$. Nicht detektierte Gallensäuren sind mit n.d. gekennzeichnet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Taurin-konjugierten, Glycin-konjugierten und unkonjugierten Formen der Gallensäuren bei männlichen und weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout- und *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Mäusen. Die Anzahl an Tieren in den einzelnen Gruppen ist: *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp männlich n=7, Wildtyp weiblich n=10, *Slc10a5*^{-/-} Knockout männlich n=10, Knockout weiblich n=10. Statistische unterschiede wurden zwischen *Slc10a5*^{-/-} Knockout- und *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Mäusen durch einen individuellen t-Test für jede Gallensäure berechnet. Werte, die sich statistisch signifikant unterscheiden, wurden **hervorgehoben** (*p<0,05).

	<i>Slc10a5</i> ^{+/+}				<i>Slc10a5</i> ^{-/-}			
	männlich		weiblich		männlich		weiblich	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Taurin-Konjugate								
T- ω -MCA	0,244	0,209	0,274	0,115	0,128	0,072	0,379	0,263
T- α -MCA	0,136	0,231	0,123	0,066	0,051	0,073	0,148	0,209
T- β -MCA	0,160	0,268	0,203	0,228	0,072	0,054	0,243	0,353
THCA	0,009	0,011	0,005	0,007	0,004	0,007	0,002	0,004
TCA	1,314	1,120	1,422	0,907	1,248	1,371	1,745	1,783
TMDCA	0,020	0,019	0,045	0,077	0,012	0,017	0,041	0,040
TUDCA	0,069	0,071	0,098	0,084	0,018	0,010	0,075	0,069
THDCA	0,017	0,010	0,031	0,028	0,028	0,026	0,044	0,042
TCDCA	0,050	0,071	0,093	0,133	0,031	0,025	0,066	0,058
TDCA	0,073	0,086	0,326	0,188	0,145	0,165	0,287	0,282
TLCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glycin-Konjugate								
G- ω -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G- α -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G- β -MCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GHCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GCA	0,034	0,008	0,038	0,015	0,027	0,008	0,032	0,012
GUDCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GHDCA	n.d.	n.d.	0,008	0,004	0,008	0,004	0,007	0,005
GCDCA	0,017	0,008	0,020	0,006	0,016	0,008	0,013	0,005
GDCA	n.d.	n.d.	0,003	0,006	0,005	0,005	0,002	0,004
GLCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unkonjugiert								
ω -MCA	0,357	0,174	1,045	0,533	0,262	0,152	0,975	0,359
α -MCA	0,040	0,015	0,195	0,146	0,037	0,013	0,172	0,077
β -MCA	0,203	0,138	0,797	0,548	0,103	0,081	0,352	0,251
HCA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,002	0,004	0,009	0,012
CA	0,330	0,126	0,952	0,560	0,377	0,213	0,504	0,349
DHCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MDCA	0,001	0,003	0,013	0,008	0,005	0,012	0,017	0,013
UDCA	0,074	0,041	0,242	0,129	0,040	0,030	0,150	0,090
HDCA	0,017	0,013	0,094	0,056	0,025	0,016	0,079	0,034
CDCA	0,013	0,013	0,036	0,026	0,009	0,010	0,013	0,017
DCA	0,142*	0,053	1,291	1,256	0,339*	0,173	0,793	0,240
LCA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

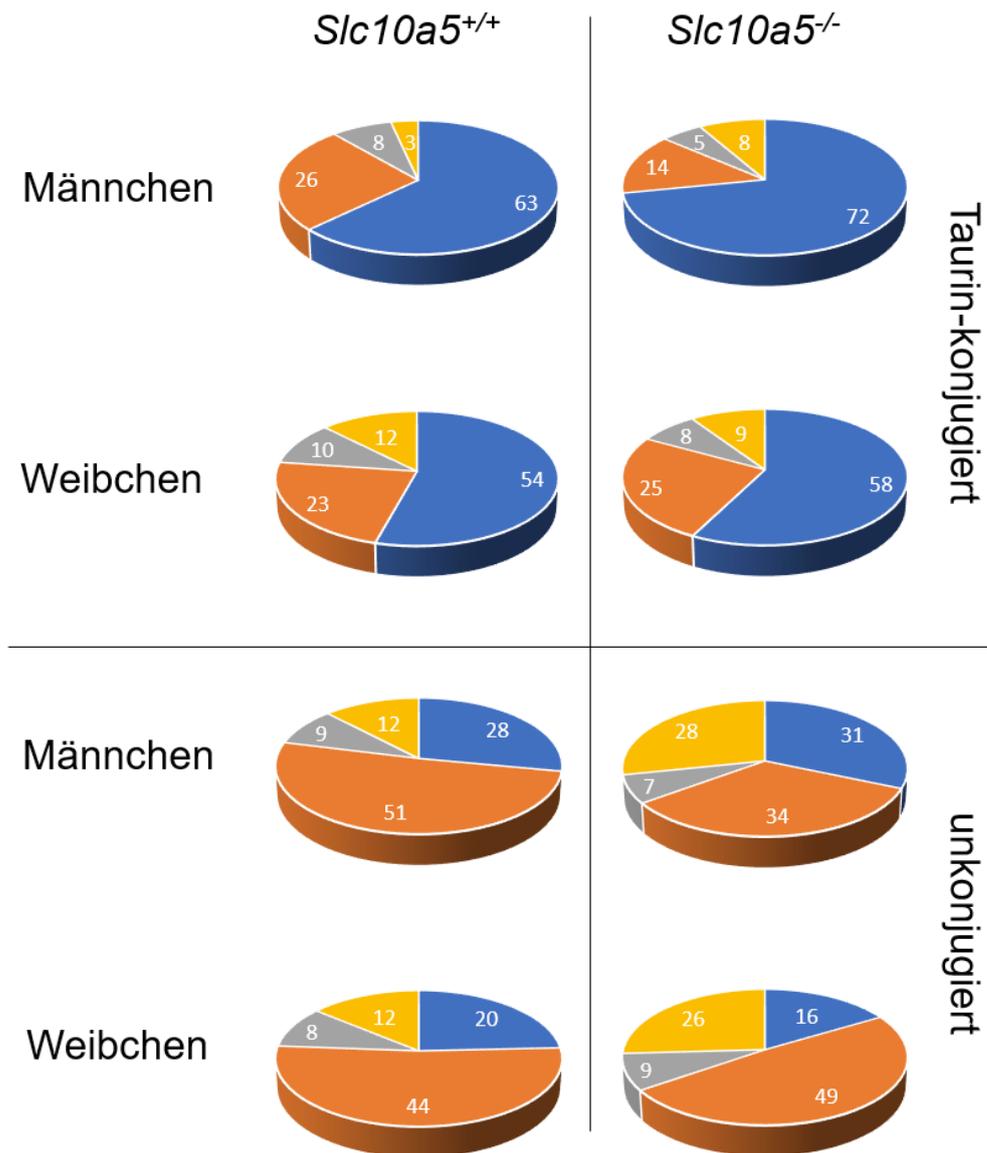


Abbildung 4-19: Verhältnisse von Taurin- und unkonjugierten Gallensäuren im peripheren Blut von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Gallensäuren Cholsäure (**blau**), Muricholsäuren (**orange**), Deoxycholsäure (**gelb**) und alle übrigen (**grau**) in ihrer Taurin-konjugierten Form (obere Hälfte) und unkonjugierten Form (untere Hälfte) im peripheren Blut. Unterschieden wird dabei zwischen männlichen und weiblichen Mäusen sowie *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Mäusen (**A**) und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen (**B**). Alle Werte sind gerundete Prozentangaben.

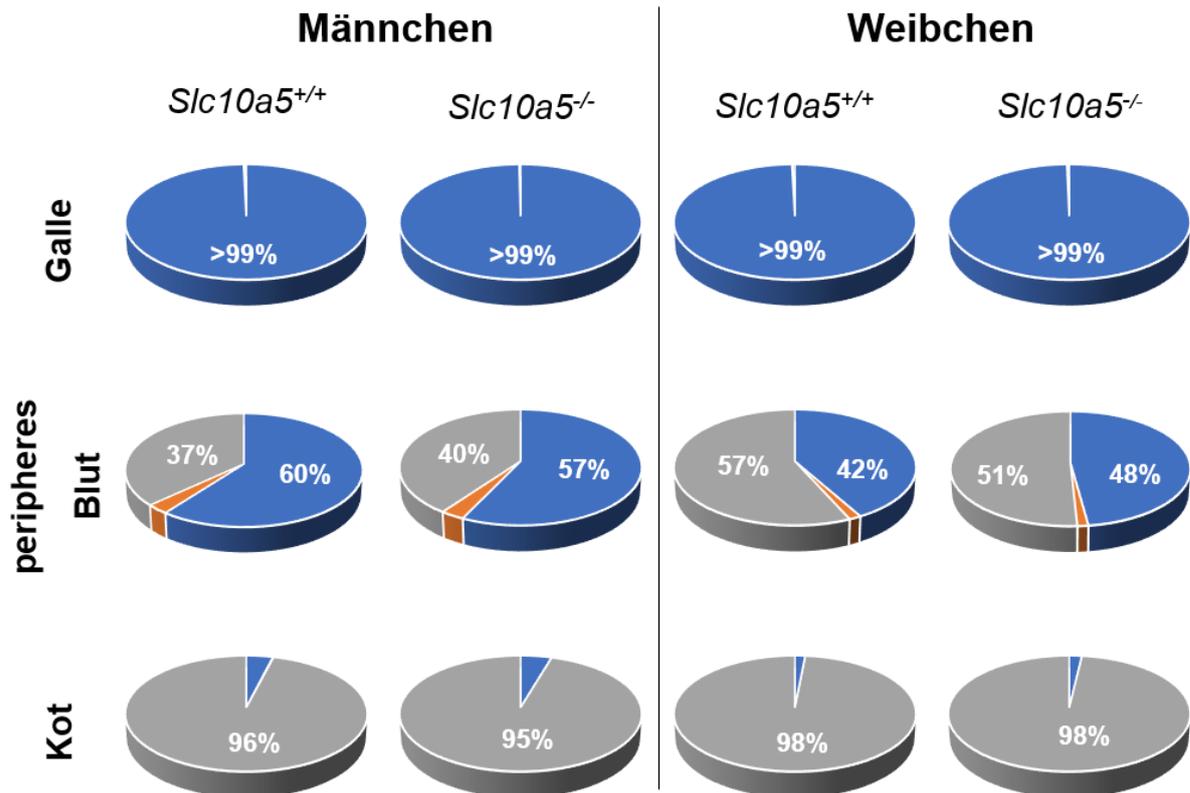


Abbildung 4-20: Konjugationsstatus des Gallensäurepools in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot

Dargestellt sind die Mittelwerte der Prozentualen Anteile von Taurin-, Glycin- und unkonjugierter Gallensäuren am Gallensäurepool der Galle, des peripheren Bluts und des Kots. Gegenübergestellt sind die Daten für männliche und weibliche *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse. In den Diagrammen sind nur Werte über 10% angegeben die mathematisch gerundet wurden. Taurin-konjugierte Gallensäuren sind **blau**, Glycin-konjugierte Gallensäuren **orange** und unkonjugierte Gallensäuren **grau**. Zur Berechnung der gezeigten Werte wurden für jede Maus die Gallensäurekonzentrationen der Taurin-, Glycin- und unkonjugierten Gallensäuren addiert und in Prozent des Gesamten Gallensäurepools umgewandelt.

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung von Verschiebungen der Verhältnisse von Gallensäuren durch den *Slc10a5*-Knockout ist der Fokus auf den Konjugationsstatus. Abbildung 4-20 zeigt diese Art der Darstellung für die Galle, das periphere Blut und den Kot. Im peripheren Blut zeigen sich zu über 99% Taurin-konjugierte Gallensäuren, im Kot zu über 95% unkonjugierte Gallensäuren. Diese Werte sind unabhängig von Geschlecht und Genotyp in allen Gruppen zu sehen. Im peripheren Blut männlicher *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse zeigt sich eine leichte Erhöhung der Anteile unkonjugierter Gallensäuren (3%) und eine entsprechende Verringerung auf Seiten der Taurin-konjugierten Spezies. Bei den weiblichen Mäusen ist dieser Trend genau umgekehrt, lässt sich jedoch im Gegensatz zu den Werten der männlichen Tiere nicht mit statistisch signifikanten Daten aus Tabelle 4-6 in Einklang bringen.

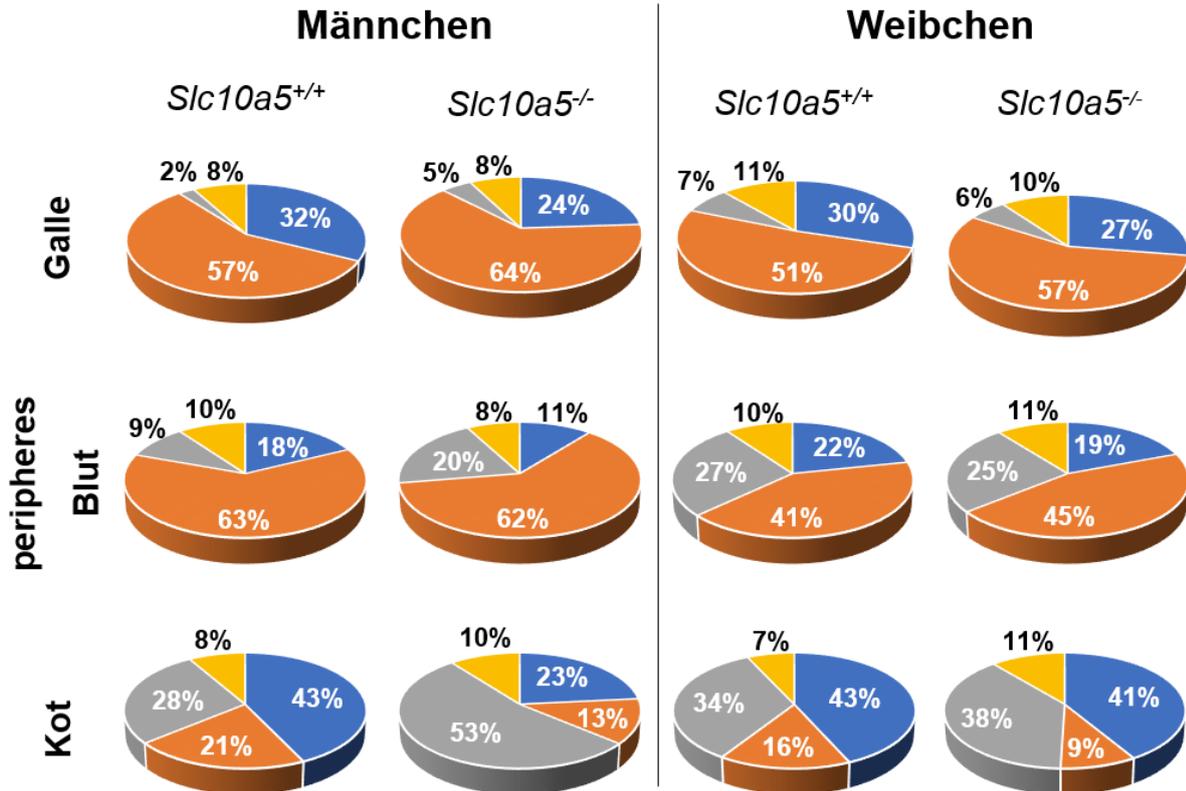


Abbildung 4-21: Hydroxylierungsstatus des Gallensäurepools in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot

Dargestellt sind die Mittelwerte der konjugations-unabhängigen Anteile der Gallensäuren Muricholsäuren (**blau**), Cholsäure (**orange**), Deoxycholsäure (**grau**) und sonstige Gallensäuren (**gelb**) im Gallensäurepool der Galle, des peripheren Bluts und des Kots. Diese beinhalten die Taurin-, Glycin- und unkonjugierten Anteile der jeweiligen Gallensäure. Unter sonstige Gallensäuren fallen Hyocholsäure, Ursodeoxycholsäure, Hyodeoxycholsäure, Chenodeoxycholsäure und Litocholsäure. α - und β - Muricholsäure wurden zu Muricholsäuren zusammengefasst. Gegenübergestellt sind die Daten für männliche und weibliche *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse. Zur Übersichtlichkeit sind nur gerundete Werte der drei Gallensäuren mit den größten Unterschieden dargestellt. Im Anhang ist eine komplette, tabellarische Darstellung für alle gemessenen Gallensäuren verfügbar. Die Berechnung der gezeigten Werte erfolgte durch Summierung der Konzentrationen der Taurin-, Glycin- und unkonjugierten Formen jeder einzelnen Gallensäure. Diese Werte wurden dann in ihren prozentualen Anteil am Gallensäurepool von Galle, peripherem Blut und Kot umgerechnet.

Neben der Auftrennung nach Konjugationsstatus des Gallensäurepools erfolgte eine äquivalente Analyse mit Fokus auf den Hydroxylierungsstatus. Dabei werden die Grundgallensäuren zusammengefasst, ohne zwischen Taurin-, Glycin- oder unkonjugierte Formen zu unterscheiden. In Abbildung 4-21 sind die Verhältnisse für die Grundgallensäuren Muricholsäure, Cholsäure, Deoxycholsäure und eine zusammengefasste Gruppe für alle anderen Gallensäuren dargestellt. Im Verhältnis der zusammengefassten Gallensäuren sind dabei in keiner Gruppe relevante Verschiebungen zu beobachten. Das Gleiche gilt insgesamt für den Gallensäurepool in der Galle. Im peripheren Blut steigt der Anteil an Deoxycholsäure bei den männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen an, wohingegen die Anteile der

Muricholsäuren und Cholsäure absinken. In den weiblichen Mäusen zeigen sich im peripheren Blut keinerlei relevante Verschiebungen. In den Kotproben ist der Anteil an Deoxycholsäure in den männlichen *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen fast verdoppelt und damit am stärksten verändert, begleitet von einem Anteiligen Verlust an Muricholsäure und Cholsäure.

4.7 Hydrophobizitätsindex

Um eine Brücke zwischen den bereits gezeigten absoluten und relativen Verschiebungen der Gallensäureprofile der *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Maus unter Standardhaltungsbedingungen und deren biologischer Relevanz zu schlagen, wurde für die Gallensäuren in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot der Hydrophobizitätsindex berechnet. Der statistische Vergleich erfolgte, wie auch bei den absoluten und relativen Gallensäureprofilen, ausschließlich geschlechterspezifisch, da die physiologischen Unterschiede des Gallensäurestoffwechsels von männlichen und weiblichen Mäusen einem geschlechterübergreifenden Vergleich entgegenwirken. Bei den männlichen Mäusen zeigte sich sowohl in der Galle als auch im peripheren Blut und den Kotproben eine signifikante Verschiebung des Hydrophobizitätsindex in Richtung eines hydrophoberen Gallensäurepools (Abbildung 4-22). Der größte Unterschied stellte sich dabei in den Kotproben dar, gefolgt von peripherem Blut und Galle. Bei den weiblichen *Slc10a5^{+/+}* Wildtyp- und *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen zeigten sich in keinem der Kompartimente tendenzielle oder signifikante Unterschiede der Hydrophobizitätsindizes. Eine detaillierte Auflistung der Hydrophobizitätsindizes für jede Maus ist verfügbar in Tabelle 7-1 im Anhang.

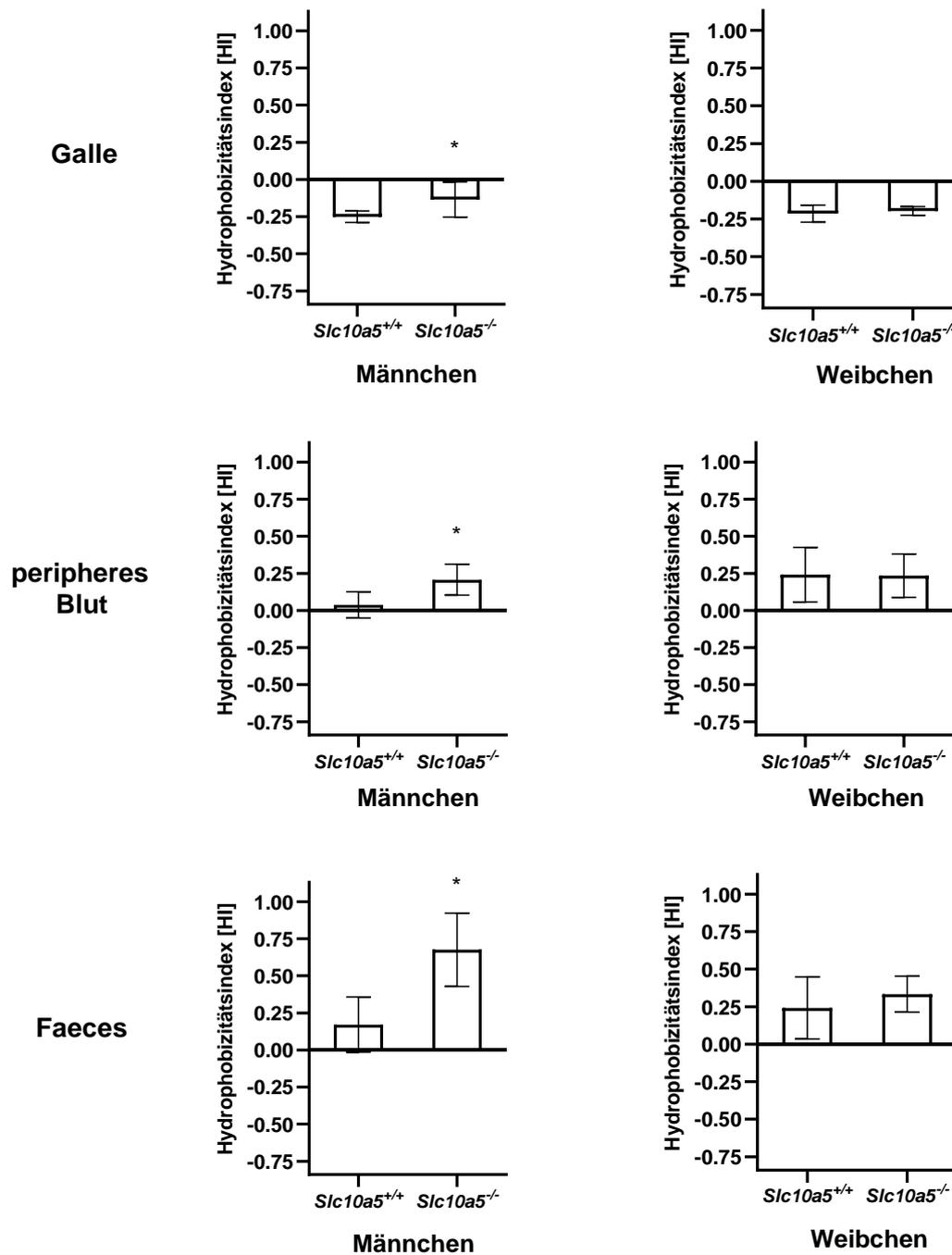


Abbildung 4-22: Vergleich der Hydrophobizitätsindizes von *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen.

Dargestellt sind die berechneten Hydrophobizitätsindizes nach Heuman (1989) in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot von männlichen und weiblichen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen. Die Hydrophobizitätsindizes setzen sich dabei jeweils aus den anteiligen Werten der Einzelindizes jeder betrachteten Gallensäure zusammen. Das Minimum der Indexskala liegt auf der hydrophilen Seite bei HI= -0,87 (α -Tauromuricholsäure) und im hydrophoben Bereich bei HI= 1,13 (Lithocholsäure). Die Balken zeigen Mittelwerte und Standardabweichung. Statistisch verglichen wurden die Unterschiede zwischen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen getrennt nach Kompartiment und Geschlecht mittels t-Test, bei signifikant unterschiedlichen Varianzen wurde der Welch's t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede sind mit einem * markiert (p<0,05).

5 Diskussion

5.1 Die Lokalisation von SLC10A5

Ziel dieser Arbeit war es, der vollständigen Charakterisierung des *Orphan Carriers* SLC10A5 Schritt für Schritt näher zu kommen. Dazu gehört zum einen die subzelluläre Lokalisation des Proteins und zum anderen die Aufklärung der molekularen Funktion. Auf Grund der Einordnung von SLC10A5 in die SLC10-Familie der Natrium-abhängigen Gallensäuretransporter lag dabei der Fokus auf der Untersuchung einer potenziellen Transportfunktion für Gallensäuren. Diese Einordnung erfolgte in erster Linie basierend auf der Sequenzidentität von SLC10A5 zu den anderen Mitgliedern der Familie. Die höchste Sequenzidentität auf Aminosäureebene wurde dabei zwischen SLC10A5 und SLC10A3 (33,9%) festgestellt, zu NTCP und ASBT sind es 22%, zu SLC10A4 21,7% und zu SOAT 20,1% (Geyer et al., 2006). Alleine betrachtet sind diese Werte noch kein eindeutiger Hinweis auf eine Beteiligung von SLC10A5 am Gallensäurestoffwechsel, zumal die Sequenzidentität zu SOAT, einem Transporter für sulfatierte Steroidhormone, nur knapp unter der von SLC10A5 zu NTCP und ASBT liegt (Geyer et al., 2006). In Kombination mit der Gewebeexpression von SLC10A5 in Leber (gemeinsam mit NTCP), Darm und Nieren (gemeinsam mit ASBT) (Fernandes et al., 2007) waren die Indizien jedoch sehr stark, dass auch dieses Protein am Enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren beteiligt sein könnte. Dieser Verdacht wurde vor allem durch die Ergebnisse, die mit Hilfe der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus in vorangegangenen Arbeiten erzielt wurden, erhärtet (Aretz, 2015). Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit detaillierter betrachtet und in den Kontext der bisherigen Daten zu SLC10A5 in der Literatur und in bestehenden Dissertationsschriften gesetzt werden.

5.1.1 Lokalisation im Gewebe

Auf zellulärer Ebene und mit Fluoreszenz-markierten SLC10A5 Konstrukten sowie Antikörpern gegen das native SLC10A5 Protein wurde in der Arbeit von Aretz (2015) bereits festgestellt, dass SLC10A5 nicht wie NTCP oder ASBT in die Plasmamembran sortiert wird, sondern in intrazellulären, vesikulären Strukturen und dem Golgi-Apparat zu finden ist. Eine Unsicherheit blieb bei dieser Beurteilung jedoch, da an das SLC10A5-Protein angehängte *tags*, in diesem Fall ein V5-*tag*, auch immer zu Veränderungen in der Faltung, Sortierung und Lokalisation von Proteinen führen können. Allerdings blieb SLC10A5 mit unterschiedlichen *tags* in diesen Aspekten vergleichbar (Aretz, 2015). Zusätzlich führt eine massive Überexpression im Zellkulturmodell in vielen Fällen zu einem zu hohen Angebot des Proteins und dadurch zu Sortierungsartefakten, die unter physiologischen Bedingungen in dieser Form nicht auftreten. Um diese Restunsicherheit zu adressieren, sollte der native SLC10A5 in Gewebeschnitten von Mäusen angefärbt werden. Da mit keinem der gegen SLC10A5 gerichteten kommerziell

erhältlichen Antikörper bislang eine spezifische Färbung des Proteins erzielt werden konnte, wurden eigene Antikörper im Kaninchen generiert. Das Ergebnis waren zwei aufgereinigte Antikörper, die gegen zwei unterschiedliche Epitope des murinen SLC10A5-Proteins gerichtet sind. Beide Antikörper wurden in Kryoschnitten von Lebern und Nieren von C57BL6/N-Mäusen getestet. Dabei zeigte der Antikörper mit der Bezeichnung 7649, der gegen den C-Terminus von SLC10A5 gerichtet ist, eine Fluoreszenzfärbung. Die Spezifität dieses Signals wurde durch die parallele Färbung von Gewebeschnitten von *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen, in denen kein Fluoreszenzsignal sichtbar war, sichergestellt. Auch hier gab es keine Hinweise auf eine Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran der Zellen, sondern es zeigte sich ein strikt intrazellulär-vesikuläres Muster. Dies bestätigte die Ergebnisse von Aretz (2015) zur intrazellulären Lokalisation und vesikulären Struktur der Fluoreszenzsignale von SLC10A5 in weiten Teilen. Anzeichen für eine Lokalisation von SLC10A5 im Golgi-Apparat, wie z.B. größere Strukturen in der Nähe des Zellkerns, gab es in der Färbung des nativen Proteins nicht. Dies spricht dafür, dass die Färbung von SLC10A5 im Golgi-Apparat eher durch die Überexpression und einem damit verbundenen Rückhalt des Proteins bedingt war, als durch eine tatsächliche funktionelle Lokalisation in diesem Kompartiment, wie von Aretz (2015) als Möglichkeit diskutiert.

Die Untersuchungen an Gewebeschnitten wurden in der Leber und den Nieren der Mäuse durchgeführt (Abbildung 4-5). In der Leber zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von SLC10A5 über das im jeweiligen Schnitt sichtbare Lebergewebe, wobei die Intensität von Leberläppchen zu Leberläppchen variierte. Bezogen auf die Zellebene bedeutete dies, dass grundsätzlich alle Hepatozyten ein mehr oder weniger starkes Signal für SLC10A5 zeigten. Diese Verteilung im Gewebe entspricht der Expression von NTCP in Hepatozyten (Stieger et al., 1994). In der Niere waren die Färbemuster beschränkt auf angeschnittene Tubuli mit isoprismatischem Epithel. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung von SLC10A5, bei denen die Leber und proximale Tubuli der Niere angefärbt waren (Fernandes et al., 2007). Zusätzlich dazu zeigten sich spezifische Färbemuster in feinen Strukturen des Glomerulären Apparats. Um welche Strukturen es sich hier im Detail handelt, ist jedoch allein durch die angefärbten Gewebeschnitte nicht konkret zu sagen und müsste mit strukturspezifischen Antikörpern in der Kolo-kalisation gezeigt werden. Auf Grund des Musters kommen dazu Proteine der verschiedenen Blätter der Bowmanschen Kapsel in Frage. Die Färbung in Teilen des Glomerulums steht in Kontrast zu der Überschneidung der Expressionsprofile von SLC10A5 mit ASBT in der Niere. ASBT ist in der Niere ausschließlich in der Membran der proximalen Tubuli zu finden (Hagenbuch und Dawson, 2004). Auch hier ist jedoch eine Funktion in der Retention von Gallensäuren und einer Minimierung der Ausscheidung von Gallensäuren über den Harn von SLC10A5, wie für ASBT beschrieben, nicht ausgeschlossen.

5.1.2 Kolokalisation im Zellkulturmodell

Das erfolgreiche Färben des nativen murinen SLC10A5 in Gewebeschnitten war ein erster wichtiger Schritt in der Beschreibung einer finalen Lokalisation des Proteins, reichte aber allein nicht aus, um eine fundierte Aussage über die subzelluläre Lokalisation treffen zu können. Um das vesikuläre Verteilungsmuster des Proteins in der Zelle weiter zu charakterisieren, wurden organellenspezifische, GFP-getaggte Fusionsproteine zusammen mit einem Fusionsprotein aus SLC10A5 und mScarlet kolokalisiert. Die Kolokalisation wurde in verschiedenen Zelllinien durchgeführt, um die Expression von SLC10A5 in Leber (HepG2- und Huh-7-Zellen) und Niere (HEK293-Zellen) abzubilden (Abbildungen 4-1, 4-2 und 4-3). Außerdem wurden alle Versuche an lebenden Zellen vorgenommen, um die dynamischen Prozesse, die vor allem in vesikulären Zellstrukturen relevant sind, besser darstellen zu können. Marker für ER, Golgi-Apparat, Peroxisomen, Mitochondrien, frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen funktionierten sowohl in HEK293- als auch in Huh-7-Zellen. In HepG2-Zellen konnten frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen angefärbt werden. Die Lokalisation von SLC10A5 in Mitochondrien und Peroxisomen kann, bezogen auf die hier erzielten Ergebnisse, ausgeschlossen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Aretz (2015), bei denen diese Organellen bereits als eher unwahrscheinliches Ziel der Sortierung von SLC10A5 beschrieben wurden. Stärkere Überlagerungen wurden im ER (39,58%) und dem Golgi-Apparat (16,85%) festgestellt. Für diese Teil-Überlagerung könnte es verschiedene Gründe geben. Zum einen wurde eine massive Überexpression von SLC10A5-mScarlet Protein in den Zellen durch den starken CMV-Promotor, der dem Gen auf dem Plasmid vorgeschaltet ist, hervorgerufen. Dies könnte zur falschen Faltung und Fehlsortierung durch ein Überangebot an rekombinantem Protein führen (Lisenbee et al., 2003). Dieser Effekt bezieht sich dabei nicht nur auf das eigentliche Zielorganell, sondern auch auf fehlsortierte Proteine, die in Kompartimenten zu finden sind, in denen sie physiologisch nicht auftreten. Ein anderer Grund für das Auffinden von SLC10A5-mScarlet im ER und dem Golgi-Apparat kann das Fluoreszenz-*tag* sein. Durch die Größe von mScarlet (332 Aminosäuren) wird die Größe des humanen SLC10A5 (438 Aminosäuren) fast verdoppelt. Dies kann ein Grund für veränderte Sortierungsmuster, das „Hängenbleiben“ von Protein in Zellkompartimenten und die sterische Hemmung der richtigen Faltung von Proteinen sein. Auch wenn die Fluoreszenzsignale des nativen SLC10A5 und die des Fusionsproteins sich rein optisch sehr ähneln, kann ein solcher Einfluss nicht ausgeschlossen werden. Für einen GFP-markierten SLC10A5 wurde der negative Einfluss auf die korrekte Sortierung des Proteins schon von Pellicoro (2008) beschrieben. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das ER mit 39,58% Überlagerung im Signal das physiologische Ziel der Sortierung von SLC10A5 darstellt. Bislang konnte für diese Theorie keine sichere Bestätigung gefunden werden. Versuche, SLC10A5 im Gewebe von Mäusen mit einem Marker für das ER gemeinsam zu färben, blieben bislang erfolglos. Im

weiteren Verlauf der Diskussion wird die Lokalisation im ER im Kontext der Ergebnisse aus der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus als bislang wahrscheinlichste Lokalisation des Proteins betrachtet.

Die stärkste Überlagerung zwischen SLC10A5-mScarlet und den Organellenmarkern waren im endosomalen Apparat bis hin zu den Lysosomen zu finden. Mit den frühen Endosomen betrug diese Überlagerung 57,05%, mit den späten Endosomen 79,60% und mit den Lysosomen 74,46%. Diese Werte deuten auf eine Lokalisation von SLC10A5 in den entsprechenden Kompartimenten hin, die auch zum rein optisch festgestellten vesikulären Verteilungsmuster passen würde. Es stellt sich jedoch auch hier die Frage, ob dies eine physiologische Sortierung von SLC10A5 in diese Organellen ist, oder ob es sich um Artefakte der Überexpression und des Fluoreszenz-Tags handelt. Deshalb wurde eine Kolo­kalisierung des nativen SLC10A5 im Mausgewebe mit dem gleichen lysosomalen Marker (LAMP-1) durchgeführt. Das Lysosom lag hier vor allem durch die degradierenden Eigenschaften und dem entsprechenden Bezug zur Überexpression im Fokus. Das Ergebnis dieser Kolo­kalisierung war eine Überlagerungsrate von durchschnittlich 23,76%. Dieser Wert wurde von der Software des Mikroskops vermutlich sehr konservativ berechnet, da es bei den Färbungen mit 2 Antikörpern einen, im Gegensatz zu den solitären Färbungen von SLC10A5, wesentlich stärkeren Hintergrund gab. Der Grenzwert der Abgrenzung von Hintergrund zu realem Signal wurde so relativ niedrig angesetzt. Bedingt durch das starke Hintergrundsignal ist es sehr wahrscheinlich, dass die physiologische Lokalisation von SLC10A5 nicht im Lysosom ist. Die hohen Kolo­kalisationsraten mit dem Lysosom lassen sich somit eher durch die Überexpression und eine Degradierung des Proteins durch das Proteasom erklären. Fluoreszenzproteine können auf Grund ihrer physikochemischen Eigenschaften in sauren Kompartimenten akkumulieren und trotz des sauren Milieus ein Fluoreszenzsignal zeigen, wie es für GFP als Fusionsprotein bereits beschrieben wurde (Katayama et al., 2008), und für strukturell ähnlich aufgebaute Fluoreszenzproteine wie mScarlet ebenfalls sehr wahrscheinlich ist. Dies zeigt, dass das Ergebnis der Lokalisationsuntersuchungen im Zellkulturmodell kritisch zu bewerten ist und in Zukunft weitere Untersuchungen mit dem nativen SLC10A5 durchgeführt werden sollten. Hierzu zählen zum Beispiel elektronenmikroskopische Untersuchungen des Proteins, bei denen die Ultrastruktur der Zielorganellen präzise betrachtet werden kann. Neben der starken Kolo­kalisierung mit den Lysosomen zeigten auch frühe und vor allem späte Endosomen starke Kolo­kalisationsraten. Auch hier spielt die kritische Betrachtung möglicher Degradierungsprozesse eine wichtige Rolle, denn die frühen und späten Endosomen dienen unter anderem als Transportweg von Proteinen, die für das Recycling bestimmt sind. Membranproteine werden dabei üblicherweise durch Bildung von Autophagosomen degradiert. Dabei werden die Organellen oder Endosomen von Lysosomen umschlossen und so abgebaut (Jin et al., 2017).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass es keinen Marker für Lysosomen gibt, der nicht auch späte Endosomen detektiert. Das liegt hauptsächlich an der Eigenschaft des späten endo-lysosomalen Apparats, regelmäßig durch zeitlich begrenzte Fusions- und Trennungsprozesse („*kiss and run*“) Hybridorganellen zu bilden und Inhalt sowie Membranbesatz auszutauschen (Vacca et al., 2016). Aus diesem Grund waren sowohl der verwendete Marker für die späten Endosomen (Rab7-GFP) als auch der lysosomale Marker (Lamp-1-GFP) eher Marker für beide Substrukturen mit einigen Überschneidungen. Im Zellkulturmodell würde diese Tatsache die ähnlichen Prozentwerte der Überlagerung von 79,60% mit dem Marker für späte Endosomen bzw. 74,46% mit dem lysosomalen-Marker erklären. Über Fluoreszenzfärbungen oder Kollokalisierungen ist diese Unsicherheit nicht aufzuklären. Auch Fluoreszenzmarker, die aus leicht basischen Aminen bestehen und so in sauren subzellulären Kompartimenten akkumulieren, wie zum Beispiel der LysoTracker (Thermo Scientific), sind dafür ungeeignet und detektieren die beschriebene Mischfraktion. Eine Möglichkeit, wie dieses Problem in Zukunft gelöst werden könnte, ist über die physikalischen Eigenschaften der Lysosomen. Diese haben eine wesentlich höhere Dichte als die späten Endosomen und lassen sich durch subzelluläre Fraktionierung über Gradientenzentrifugation voneinander trennen. Ursprünglich wurden späte Endosomen, vor ihrer Beschreibung als eigenständige Funktionseinheit der Zelle, als *light lysosomes* bezeichnet, da sie in den damals durchgeführten Experimenten zu Lysosomen durch diese Eigenschaften auffielen (Bainton, 1981; Vacca et al., 2016).

Zusammengefasst bietet die Kombination aus den durchgeführten Kollokalisierungen mit dem SLC10A5-mScarlet Fusionsprotein und dem nativen SLC10A5 im Mausgewebe einen Hinweis darauf, dass SLC10A5 im ER lokalisiert ist. Überschneidungen mit dem endo-lysosomalen Apparat sind am wahrscheinlichsten auf eine Überexpression des Proteins und die daraus folgende Degradierung zusammen mit einer Akkumulation des leicht basischen Fusionsproteins mScarlet im sauren Milieu zu erklären. Das vesikuläre Verteilungsmuster von SLC10A5, das in dieser Arbeit sowohl in der Zellkultur als auch im Gewebe von Mäusen gesehen wurde, widerspricht einer Lokalisation im ER nicht. Bei einer ungleichmäßigen Verteilung und Sortierung von SLC10A5 über das ER in funktionell spezialisierten Bereichen ist es durchaus denkbar, dass ohne Sichtbarmachung des ER der Eindruck einer vesikulären Verteilung entsteht. Möglich ist jedoch auch eine Kombination der Lokalisation in aus vom ER abgeschnürten Vesikeln und der Membran des ER, die das vesikuläre Bild unter dem Mikroskop entstehen lässt. Hier wäre eine elektronenmikroskopische Untersuchung von SLC10A5 möglicherweise aufschlussreich. Neue Betrachtungsweisen, die durch diese Lokalisation im Hinblick auf die molekulare Funktion von SLC10A5 und die Relevanz im Gallensäurestoffwechsel möglich werden, werden in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit im Kontext des Phänotyps der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus diskutiert.

5.2 Untersuchung der molekularen Funktion von SLC10A5

5.2.1 Transportmessungen über die Plasmamembran

Die familiäre Zuordnung zu beschriebenen Transportsystemen wie NTCP und ASBT rückte schon früh eine Rolle als Transporter in den Fokus der Untersuchungen zur molekularen Funktion von SLC10A5. Erste *in vitro* Versuche in *Xenopus laevis*-Oozyten konnten keine Transportaktivität für Cholat und Taurocholat sowie die sulfatierten Steroide Estron-3-Sulfat und DHEAS zeigen (Fernandes et al., 2007). Daraufhin folgten weitere Transportversuche in intakten und permeabilisierten HEK293-Zellen mit Cholat, Deoxycholat, Ursodeoxycholat, Sarcosincholat, Taurocholat, Taurodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat, Glycodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat und Glycochenodeoxycholat, die ebenfalls negativ ausfielen (Aretz, 2015). Die verwendeten Methoden beschränkten sich zu diesem Zeitpunkt auf Transportsysteme, die ideal mit Plasmamembranproteinen funktionieren und deren Aktivität zuverlässig abbilden. Die intrazelluläre Lokalisation von SLC10A5 wurde dabei durch die Permeabilisierung der HEK293-Zellen adressiert, wobei nicht endgültig zu sagen ist, ob eine Transportaktivität dadurch überhaupt gezeigt werden konnte (Aretz, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt, um einen intrazellulären Transport von Gallensäuren zu zeigen. Zusätzlich wurde auf Grund der Ergebnisse des *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus Versuchs von Aretz (2015), bei dem sich unter einer Fütterung von 0,5% Cholsäure ein massives Defizit Taurin-konjugierter Gallensäuren zeigte, Taurin als potentielles Substrat von SLC10A5 in Betracht gezogen. Der erste Ansatz war die „Plasmamembran-optimierte“ Transportmessung in intakten HEK293-Zellen mit einer Chimäre aus SLC10A5 und dem C-terminalen Ende von NTCP. Dieses C-terminale Ende sollte eine stabile Sortierung von SLC10A5 in die Plasmamembran ermöglichen, ohne die grundlegende Proteinstruktur zu stark zu beeinflussen. Dieses Prinzip wurde bereits erfolgreich für eine Chimäre aus SLC10A4 und dem C-terminalen Ende von NTCP beschrieben (Schmidt et al., 2015). Die Plasmamembranexpression der Chimäre wurde durch Immunfluoreszenzfärbung eines FLAG-Tags am C-Terminus des Proteins bestätigt und zeigte im Vergleich zur entsprechenden NTCP Färbung eine ähnliche Intensität des Signals in der Plasmamembran. Die SLC10A5ctNTCP-Chimäre wurde stabil in HEK293 Zellen transfiziert und Transportmessungen mit den Tritium-markierten Substraten Cholat, Deoxycholat, Ursodeoxycholat, Taurocholat, Taurodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat, Glycodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat, Glycochenodeoxycholat, Taurolithocholat und Taurin durchgeführt. Außerdem erfolgte die Messung bei unterschiedlichen pH-Werten (5,5 und 7,4) des Transportpuffers, um sich an die Bedingungen der sauren Kompartimente anzunähern und unter Umständen einen pH-abhängigen Transport abzudecken. Bei keinem der Substrate zeigte sich ein signifikanter Unterschied der

gemessenen Zerfälle pro Minute und somit keine Transportaktivität. Das gewählte *in vitro*-System beinhaltet allerdings auch einige Schwachpunkte, die keine endgültige Aussage über die vorhandene bzw. nicht vorhandene Transportaktivität von SLC10A5 erlauben. Die Verwendung einer Chimäre und der räumliche Wechsel in ein anderes Zellkompartiment bringen SLC10A5 in ein sehr artifizielles System, das die eigentliche Funktion behindern kann. Außerdem könnte die Orientierung in der Membran, die Transportrichtung und die korrekte Faltung der Tertiärstruktur der Chimäre und des nativen Proteins starke Unterschiede aufweisen und die gewählte Methode negativ beeinflussen.

5.2.2 Transportmessungen in Membranvesikeln

Um diese Faktoren zu umgehen und einen realitätsnäheren Versuchsaufbau zu gewährleisten, wurde als zweiter Ansatz die Transportmessung des nativen SLC10A5-Proteins in Membranvesikeln gewählt. Auch hier wurden die oben aufgelisteten Substrate zur Messung verwendet und der Versuch bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die generelle Funktionalität des Versuchsaufbaus wurde mit BSEP-Vesikeln und einem Transport von Taurocholat unter Verbrauch von ATP bestätigt. SLC10A5 zeigte bei keinem der gemessenen Substrate einen signifikanten Unterschied in der Aufnahme in die Vesikel und somit keine Transportaktivität. Eine große Unsicherheit bei diesen Ergebnissen bleibt durch die fehlende Bestätigung des Vorhandenseins von SLC10A5-Protein in den Vesikeln. Es konnte in keinem der durchgeführten *Western Blots* ein Signal für SLC10A5 gezeigt werden, wobei auch die Positivkontrollen, in diesem Fall die Suspension der SLC10A5-HEK293 Zellen, aus der die Vesikel generiert wurden, keinerlei Signale im *Western Blot* aufwiesen. Dadurch ist nicht zu sagen, ob die generierten SLC10A5-Vesikel überhaupt das erwünschte Protein in ausreichender Menge in den Membranen trugen. Zusätzlich waren auch bei diesem Versuchsaufbau viele Variablen in Bezug auf die Transportbedingungen vorhanden. Für Taurin zeigte sich, im Gegensatz zu den gemessenen Gallensäuren, eine leichte Tendenz zu einer Aufnahme in die Vesikel. Dies ist vor allem interessant, da Taurin in Kontrast zu den Gallensäuren sehr viel hydrophiler ist und Lipidmembranen ohne Hilfe nicht überwinden kann. Beweis dafür sind die steigenden Hintergrundwerte der Messungen in den Vesikeln bei den lipophileren Gallensäuren wie Taurolithocholat (80.000 - 100.000 dpm) gegenüber Taurin (300 – 500 dpm). Die Tendenzen von 1,28:1 bei pH 7,4 und 1,49:1 bei pH 5,5 könnten somit Indizien für eine Interaktion von SLC10A5 und Taurin sein, wobei diese nicht unbedingt ein Transport sein muss, sondern es sich auch um eine reine Bindung handeln könnte. Um diese Ergebnisse weiter zu untersuchen, müsste ein stabileres und steuerbareres Transportsystem genutzt werden. In Frage kämen hier zum Beispiel Messungen in Liposomen mit vorher aufgereinigtem SLC10A5, bei denen sich dann der Membranbesatz auf das gewünschte Protein beschränken würde.

Zusammen mit den Ergebnissen aus der Arbeit von Fernandes (2007) und Aretz (2015) deuten die gewonnenen Daten dieser Arbeit nicht auf eine Transportfunktion von SLC10A5 für die gemessenen Gallensäuren oder Taurin hin. Es bleibt jedoch eine Unsicherheit übrig, durch die eine Transportaktivität nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Unter Umständen sind die Bedingungen, die für die korrekte Funktion von SLC10A5 nötig sind, nur bei der Betrachtung eines komplexen Gesamtorganismus darzustellen. Deshalb sollte die Suche nach der molekularen Funktion von SLC10A5 in den Kontext der intrazellulären Lokalisation von SLC10A5 und vor allem den *in vivo* Daten aus der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus gestellt werden.

5.3 Die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

5.3.1 Vorangegangene Untersuchungen der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mauslinie

Die getrennte Betrachtung der Lokalisation und der molekularen Funktion von SLC10A5 erwies sich bislang als schwierig. Sowohl die Komplexität des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren als auch die Expression des Proteins in unterschiedlichen Organen erschwerten die Untersuchung. Für die weitere Charakterisierung von SLC10A5 war es deshalb unerlässlich, beides in Kombination zu betrachten. Aus diesem Grund wurde die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus generiert und gezüchtet. Sie ermöglichte erstmals eine detaillierte Betrachtung der Vorgänge im lebenden Organismus und machte Hoffnung auf Rückschlüsse zur Funktion und Lokalisation von SLC10A5. Doch zuerst musste die Frage geklärt werden, ob die sequenzbedingte Verwandtschaft und die überlappenden Expressionsprofile mit NTCP und ASBT nur Zufall waren oder ob in der Realität ebenfalls eine Beteiligung im Gallensäurestoffwechsel zu finden ist. Ein weiterer Faktor, warum die *Slc10a5* Knockout-Maus für die Untersuchung des Proteins wichtig war, waren die Ergebnisse zur Regulierung des Kernrezeptors FXR von Pellicoro (2008), der das Bindeglied zwischen Gallensäuren und deren Regulierung darstellt. *In vitro* führte die Aktivierung von FXR durch Chenodeoxycholat nämlich zu einer massiven Herunterregulierung von SLC10A5 (Pellicoro, 2008). Die Aktivierung von FXR durch Gallensäuren führt auch bei NTCP (Matsubara et al., 2013) und ASBT (Modica und Moschetta, 2006) zu einer Reduktion der Genexpression und stellt eine Schutzfunktion vor einer zu starken Erhöhung der intrazellulären Gallensäurekonzentration dar (Matsubara et al., 2013; Dawson, 2017).

Im Rahmen der Dissertation von Aretz (2015) wurde die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus erstmals untersucht. Unter Standardhaltungsbedingungen zeigte sich kein offensichtlicher Phänotyp und auch die Zucht der Tiere wies normale Fertilitätsparameter und insgesamt keine Belastung der Mauslinie auf. Um einen ersten Anhaltspunkt der Auswirkungen von SLC10A5 auf den Gallensäurestoffwechsel zu bekommen, wurde ein Pilotversuch mit männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen durchgeführt. Dieser Versuch bestand aus einer einwöchigen Fütterung von 0,5% Cholsäure und anschließender massenspektrometrischer Analyse der

Zusammensetzung des Gallensäurepools. Unter Cholatfütterung zeigten die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse im Gegensatz zu den Kontrolltieren pathologische Veränderungen des Darmkonvoluts und die Gallensäuremessungen ergaben eine Verschiebung des Pools zugunsten lipophilerer unkonjugierter Gallensäurespezies. Die Arbeit von Aretz (2015) zeigte also zwei wichtige und grundlegende Fakten zur *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus auf. Zum einen konnte die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus unter Standardhaltungsbedingungen den Verlust des Gens bzw. Proteins kompensieren, ohne sich im Verhalten, dem äußeren Erscheinungsbild oder den Gallensäureprofilen von den Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden. Auf der anderen Seite stand der massive Phänotyp der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus unter Fütterung einer Diät mit 0,5% Cholat. Die Überladung des Enterohepatischen Kreislaufs mit Cholat und die so künstlich herbeigeführte Cholestase führte zu einem Versagen der Kompensation des Gen-Knockouts und einem Defizit bei der Taurinkonjugation. Zusätzlich zu den Ergebnissen der Gallensäureanalytik waren die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse schon zu Versuchsbeginn signifikant leichter als die Wildtyp Tiere, was auf einen veränderten Energiestoffwechsel hindeutete (Aretz, 2015). Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal einen Effekt von SLC10A5 *in vivo* und bestätigten die Vermutung, dass das Protein eine Relevanz im Gallensäurestoffwechsel hat.

Über die präzise molekulare Funktion ließen sich jedoch nur Überlegungen anstellen, keinesfalls jedoch eine finale Aussage treffen. Dies lag unter anderem daran, dass eine Hyperämie des Darms, wie sie bei den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen unter Cholatfütterung beobachtet wurde, immer auch die physiologische Funktion und Barriereeigenschaften der Darmmukosa beeinträchtigt. Für Gallensäuren bedeutet das, dass die Wiederaufnahme von konjugierten Gallensäuren gegebenenfalls eingeschränkt ist, wohingegen unkonjugierte, lipophilere Gallensäuren weiterhin passiv die Enterozyten passieren können. Diese pathologische Interaktion von Gallensäuren und der intestinalen Mukosa ist für verschiedene Krankheitsbilder beschrieben, unter anderem für die Chrohn'sche Krankheit, ulzerative Colitis und Tumoren des Darmtrakts, sowie allgemeine Steuerung entzündlicher Prozesse (Jahnel et al., 2014; Guo et al., 2015; Gadaleta et al., 2017). Im Kontext der Ergebnisse des *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus Versuchs von Aretz (2015) blieb so die Frage nach dem Ursprung der Veränderungen. Es galt zu klären, ob sich die erhöhten Konzentrationen unkonjugierter Gallensäuren primär durch eine Veränderung der intestinalen Reabsorption zeigten oder ob das Konjugationsdefizit in den Hepatozyten Ursache für die erhöhte Konzentration zytotoxischer Gallensäuren und der beobachteten Pathologie war. Ein weiterer Faktor, der einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Gallensäuren in diesem Versuch genommen haben könnte, war das Mikrobiom der Mäuse. Die C57BL6N-Kontrolltiere wurden vom Züchter zugekauft, die Knockout-Tiere im eigenen Tierstall gezüchtet. Somit bestand die Möglichkeit, dass sich das Mikrobiom der Mauslinien voneinander unterschied, was einen Einfluss auf die

Gallensäureprofile haben könnte. Wie von Aretz (2015) bereits beschrieben, war das Konjugationsdefizit der Knockout-Mäuse zwar die wahrscheinlichste Erklärung, im Kontext der Gewichtsunterschiede und möglicherweise signifikanter Abweichungen der Darmflora der Mauslinien müssten jedoch weitere Untersuchungen der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus folgen, um diese Möglichkeit zu prüfen.

5.3.2 Energie und Stoffwechselbilanz der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Gallensäuren sind nicht nur essentielle Bestandteile der Verdauung von Lipiden, sondern nehmen eine Vielzahl von weiteren Rollen im Stoffwechsel ein. Die Interaktion von Gallensäuren mit den Kernrezeptoren FXR oder dem G-Protein gekoppelten Rezeptor TGR5 ermöglichen die Regulierung von verschiedensten metabolischen Prozessen im Organismus. Dazu zählen unter anderem der Glucosestoffwechsel, Energieverbrauch, die Beteiligung an der Regulation von Entzündungen und dem Auf- bzw. Abbau von Muskelmasse (Ma et al., 2006; Kobayashi et al., 2007; Lefebvre et al., 2009; Benoit et al., 2017; Shapiro et al., 2018). Viele der genannten Funktionen, inklusive der Lipidverdauung, haben einen direkten Einfluss auf das Körpergewicht und die Effizienz der intestinalen Energieverwertung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl ein Einfluss von SLC10A5 auf den Energiehaushalt der Maus, als auch die Gallensäureprofile in den Abschnitten des Enterohepatischen Kreislaufs unter Standardfütterungsbedingungen untersucht werden. Dieser Ansatz basierte auf der Vermutung, dass ein so massiver induzierbarer Phänotyp, wie von Aretz (2015) beschrieben, möglicherweise nicht zu 100% kompensiert wird, sondern sich auch unter Normalbedingungen die Auswirkungen des fehlenden Gens im Detail finden lassen. Um beide Endpunkte des Versuchs gleichzeitig zu adressieren, bestand die Untersuchung der Mäuse aus zwei Abschnitten: einer regelmäßigen Untersuchung der Stoffwechselfparameter Gewicht, Futteraufnahme und Kotabsatz sowie einer Bilanzierung des Energieverbrauchs über einen Zeitraum von 6 Monaten. Abschließend folgte die Analyse von Gallensäurekonzentrationen im Portalblut, Blut des Körperkreislaufs, Gallenflüssigkeit und Kotproben aus dem Enddarm. Die dazu gewählte Mäusepopulation bestand aus je zehn weiblichen und zehn männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen und einer gleich großen Gruppe C57BL6/N Wildtyp-Mäuse zur Kontrolle. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Elterntiere und die Tiere des Versuchs im selben Raum der Tierhaltung gehalten und gezüchtet wurden, um ähnliche Voraussetzungen zur Entwicklung des Mikrobioms zu bieten. Auch während des Beobachtungszeitraums von 6 Monaten wurden alle Käfige im selben Raum in direkter Nähe zueinander platziert, um auch hier gleiche Voraussetzungen und Umweltfaktoren zu schaffen. Die Tiere wurden über den gesamten Zeitraum der Beobachtung, vom Absetzen bis Woche 26, zu je zwei Tieren pro Käfig gleichen Geschlechts und gleichen Genotyps gehalten. Der Zucht dieser Tiere war eine Analyse des genetischen Status und des nicht-rekombinierten

Genbereichs vorausgegangen, um weitere Einflussfaktoren auf den Energiestoffwechsel oder Gallensäurestoffwechsel auszuschließen.

5.3.3 Genetischer Status und nicht-rekombinierte Genbereiche der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Nicht-rekombinierte Genombereiche in Knockoutmaus-Modellen können einen massiven Einfluss auf den Phänotyp haben. Vor allem bei der Betrachtung des Energiehaushalts und des Stoffwechsels können die Gene aus den Linien, in denen der Knockout generiert wurde den Vergleich mit den Kontrolltieren massiv verfälschen (Lusis et al., 2007). Um den Einfluss dieser *passenger genes* zu identifizieren und zu bewerten, wurden zwei Herangehensweisen gewählt. Die Rückkreuzungen der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus, beschrieben von Aretz (2015), wurden im Rahmen der Erhaltung der Mauslinie im gleichen Stil weitergeführt und sollten im Idealfall die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mauslinie soweit vereinheitlichen, dass bis auf die Selektionskassette am Ort des Genknockouts das komplette Genom dem der C57BL6/N-Maus entsprach. Der Fortschritt dieser Rückkreuzungen wurde mittels *Speedcongenics*, einer SNP gestützten Kontrolle des Genoms, kontrolliert. Die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit bei einem Generationsäquivalent von NE8 bzw. einer Übereinstimmung des Genoms in Bezug auf die C57BL6/N von 99,77%. Die ersten 32 Millionen Basenpaare von Chromosom 3 konnten der C57BL6/N-Linie nicht zugeordnet werden und beinhalteten noch genetisches Material der 129SvEvBrd Mauslinie. Um über Rückkreuzungen eine gezielte Rekombination dieser Genbereiche zu erzielen, müssten rein statistisch gesehen große Mengen an Mäusen in Inzuchtverpaarungen gezüchtet werden, um das gewünschte Ergebnis zu erreichen. Im Sinne des 3R-Prinzips war diese Vorgehensweise nicht zu realisieren, da hunderte Tiere angefallen wären, die keinerlei Veränderung des genetischen Status gezeigt hätten. Es wurde eine Auflistung der nicht-rekombinierten Gene des 32 Millionen Basenpaare langen Beginns von Chromosom 3 erstellt, die alle Gene außer Pseudogene und Genvorhersagen enthält (Tabelle 4-2). Nur ein Gen ist im Hinblick auf den Gallensäure- und Energiestoffwechsel ein *passenger gene*, das die Ergebnisse der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus verfälschen könnte. *Cyp7b1* kodiert für das Enzym Oxysterol-7-Alpha-Hydroxylase, welches Teil des alternativen Gallensäuresynthesewegs und daher beteiligt an der *de novo* Synthese von Chenodeoxycholat ist (Chiang 2013). Die Genexpression war in den männlichen Tieren, bei denen die im weiteren Verlauf diskutierten Unterschiede der Gallensäureprofile auftraten, nicht unterschiedlich. Bei den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Weibchen war die Expression des *Cyp7b1*-Gens nur leicht erhöht, ohne dass signifikante Unterschiede in den Gallensäurekonzentrationen gezeigt werden konnten. Daher ist ein Einfluss von *Cp7b1* auf den Gallensäurestoffwechsel beider Genotypen nicht zu erwarten.

5.3.4 Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme

Gallensäuren greifen an verschiedenen Stellen so in den Stoffwechsel ein, dass der Energiehaushalt von Säugetieren moduliert wird (Zhang et al., 2011). Dazu zählt nicht nur die Solubilisierung von Lipiden im Darm und der Einfluss auf den Cholesterinhaushalt, sondern auch der Glukosestoffwechsel und eine hormon-ähnliche Wirkung auf die Schilddrüse (Watanabe et al., 2006; Di Ciaula et al., 2017; Shapiro et al., 2018). Die Gallensäure-bedingte Regulation dieser Prozesse und die damit verbundene Einflussnahme auf den Energiehaushalt des gesamten Organismus erfolgt über den Kernrezeptor FXR und den G-Protein-gekoppelten Rezeptor TGR5 (Kawamata et al., 2003; Thomas et al., 2008). Zusätzlich beeinflusst der mikrobielle Besatz des Darms das Verhältnis der Gallensäuren untereinander, da Bakterien sowohl für eine Dekonjugation von Taurin- bzw. Glycin-konjugierten Gallensäuren sorgen als auch verantwortlich sind für die Entstehung sekundärer Gallensäuren durch Veränderung von spezifischen Hydroxylgruppen (Ridlon et al., 2014). Im Hinblick auf diese Faktoren zeigte sich SLC10A5 in der Arbeit von Aretz (2015) als relevantes Protein in der Gallensäurehomöostase unter Fütterung von Cholsäure. Außerdem waren die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse schon vor Beginn der Fütterung signifikant leichter als die entsprechenden Wildtyp-Tiere. In Kombination mit der *in vitro* beobachteten, SLC10A5 bedingten Modulation von FXR (Pellicoro, 2008) deutete vieles auf eine Beeinflussung des Energiehaushaltes hin. Deswegen wurden in dieser Arbeit über einen Zeitraum von sechs Monaten verschiedene Parameter untersucht, die Verschiebungen des Energiestoffwechsels anzeigen können. Neben einfachen klinischen Parametern wie der Futteraufnahme der Mäuse und dem Körpergewicht, wurde auch der Energiegehalt des Kots betrachtet. Vor allem mit dem Einfluss des Mikrobioms auf die Darmphysiologie und dem damit verbundenen Einfluss auf den Gallensäurepool sollte die Analyse von Energie im Kot einen ersten Eindruck geben, ob der Knockout von *Slc10a5* zu Veränderungen in diesem Bereich führt. Daten zu den Körpergewichten der Tiere und die Futteraufnahme pro Käfig wurden einmal wöchentlich beim Umsetzen der Tiere in frische Käfige erhoben, um die Belastung der Tiere zu minimieren. Der Kot wurde auf Grund des großen Aufwands einmal pro Monat gesammelt und analysiert.

Es zeigten sich über die gesamte Dauer von sechs Monaten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gewichten der männlichen und weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse und denen der Wildtyp-Tiere. Auch die wöchentlich erhobenen Daten zur Futteraufnahme der Mäuse zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Ausschläge innerhalb der Futteraufnahmedaten einer Gruppe, wie zum Beispiel zwischen Woche 11 und 13 der männlichen Mäuse, ließen sich dabei auf äußere Einflüsse zurückführen. Diese waren meistens Umstrukturierungen der Haltungsräume wie in diesem Fall das Anbringen eines neuen Schrankes. Die Daten zeigen, dass eine vergleichbare Futteraufnahme der Mauslinien zu vergleichbaren Gewichtsentwicklungen führen. Dies spricht für einen

unveränderten Energiestoffwechsel der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus im Vergleich mit der C57BL6/N-Maus. Wäre die Energiehomöostase der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus verändert, würde das entweder veränderte Gewichte nach sich ziehen und je nach Ausmaß auch eine Veränderung der Futteraufnahme bedingen, oder eine kompensatorisch höhere Futteraufnahme. Zwei Faktoren, die mögliche genetisch bedingte Einflüsse verdeckt haben könnten, sind die *ad-libitum* Fütterung der Tiere oder die laborbedingten Umwelteinflüsse. Feine Unterschiede im Energiestoffwechsel könnten erst bei Nahrungsknappheit oder bei niedrigeren Temperaturen zum Tragen kommen. Die Unterschiede in der Gewichtsentwicklung der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus in Bezug auf die Wildtyp-Tiere, die von Aretz (2015) beschrieben wurden, lassen sich am wahrscheinlichsten über die Wurfgrößen für die jeweils beschriebene Population erklären. In der Arbeit von Aretz (2015) kamen die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse, die für den Versuch verwendet wurden, aus einem Wurf mit 11 Nachkommen und aus einem Wurf mit 15 Nachkommen. Die Wildtyp-Tiere kamen aus 2 Würfen mit jeweils 6 Nachkommen. Die Wurfgröße hat einen großen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Nachkommen. Dies liegt vor allem an der Kapazität des Gesäuges des Muttertiers und der damit verbundenen Nährstoffversorgung der Welpen. Bis zu 11 Jungtiere können dabei nahezu vollständig mit Milch in ausreichender Menge versorgt werden. Bei größeren Würfen wird die gleiche Menge an Milch auf die Jungtiere aufgeteilt, was sich in einer langsameren Gewichtsentwicklung zeigt (Epstein, 1978; Agnish, 1997). Dieser Effekt ist bei den Daten von Aretz (2015) und den beschriebenen Wurfgrößen von 15 und 11 gegenüber 6 sehr wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb darauf geachtet, dass die Wurfgrößen eine Anzahl von 11 Tieren nicht überschreiten. Eine biologische Streuung ist dabei trotzdem normal und auch sichtbar (Abbildung 4-10). Bei zukünftigen Versuchen mit der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus könnte man diesen Einfluss weiter minimieren, indem man nach der Geburt die Mäuse einer Linie so auf die Muttertiere verteilt, dass man eine gleichmäßige Verteilung erreicht. Die Mäuse sollten dabei frühestens ab dem 4. Tag nach der Geburt aufgeteilt werden und das Geschlechterverhältnis sollte ebenfalls gleich gehalten werden (Epstein, 1978). Trotz der biologischen Streuung zeigen die Gewichtsdaten der Mäuse in dieser Arbeit jedoch eindeutig, dass der Energiestoffwechsel und die Futteraufnahme unter den Versuchsbedingungen durch den Gen-Knockout nicht beeinträchtigt wurden.

5.3.5 Kalorimetrische Untersuchungen

Zusätzlich zur Erhebung der Gewichtsdaten und der Futteraufnahme wurde die Energie, die durch das Futter aufgenommen wurde, mit der Energie im ausgeschiedenen Kot verglichen und bilanziert. Die Daten wurden dabei immer von einem Käfig erhoben und stellten Mittelwerte von 2 Mäusen dar. Diese Werte waren somit immer nur eine Annäherung an die einzelne Maus, da innerhalb der Käfige die Gewichte stark variierten und davon auszugehen war, dass die schwerere der beiden Mäuse auch die dominantere bei der Futteraufnahme war.

Beim Vergleich der Trockengewichte der Kotmengen zeigte sich nur bei den weiblichen Tieren ein signifikanter Unterschied. Die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Weibchen schieden dabei größere Mengen an Kot aus als die Wildtyp-Weibchen. Eine rein makroskopische Betrachtung der Kotproben beim Einsammeln zeigte keinerlei Unterschiede. Der Hauptgrund für die Veränderung von Kotmengen ist eine verlangsamte bzw. beschleunigte Darmpassagezeit. Eine langsamere Darmpassage führt zu einer geringeren Menge an ausgeschiedenem Kot, da die Resorptionszeit höher ist, eine schnellere Darmpassage steigert hingegen die ausgeschiedene Kotmenge. Modulator der Passagezeit ist dabei hauptsächlich die Darmmotilität (Li et al., 2006). Bei den weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen bedeutet das, dass die Darmmotilität im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren erhöht gewesen sein könnte, was über den Zeitraum von sechs Monaten insgesamt zu einer höheren Menge an ausgeschiedenem Kot führte. Ursachen für eine Veränderung der Darmmotilität sind vor allem Unterschiede in der Zusammensetzung der aufgenommenen Nahrung und die daraus resultierende Anpassung der mikrobiellen Darmflora. Der Prozess der Anpassung der mikrobiellen Flora ist kein schneller Vorgang, sondern eine stetige Anpassung an die zur Verfügung stehende Nahrung (Kashyap et al., 2013; Müller et al., 2018).

Für Gallensäuren wurde ein direkter Einfluss auf das Mikrobiom beschrieben. Dieser spiegelt sich nicht in einer Veränderung der Anzahl vorhandener Bakterienspezies wider, sondern ist gekennzeichnet durch Verschiebungen der Verhältnisse der dominanten Bakterienspezies und somit einer Veränderung innerhalb des Bakterienprofils des Darms (Just et al., 2018). Die erhöhte Kotmenge bei den weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen könnte somit ein Hinweis auf eine Verschiebung des Gallensäureprofils sein, die reflektorisch eine Anpassung der mikrobiellen Flora nach sich zieht. Bei der Betrachtung der verdaulichen Energie, also der aufgenommenen Energie abzüglich der im Kot gemessenen Energie, zeigte sich bei beiden Geschlechtern kein signifikanter Unterschied zwischen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen und Wildtyp-Tieren. Dieses Ergebnis war ein Indiz dafür, dass trotz schnellerer Darmpassage die Resorption der Nährstoffe identisch blieb. Ein Grund dafür war vermutlich die *ad libitum* Fütterung der Mäuse und damit die Nahrungszufuhr, die weit über dem benötigten Minimum lag. Ob eine Standardfütterung der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus durch eine veränderte Beeinflussung des Mikrobioms auch einen Einfluss auf die Energieaufnahme und Verwertung der Maus hat, ließe sich nur über eine Fütterung herausfinden, die den Erhalt der minimal benötigten Kalorienzufuhr gewährleistet. So würden potentielle Einflüsse stärker bzw. überhaupt erst zum Tragen kommen. Im Falle der vorliegenden Arbeit scheint der Effekt jedoch so gering zu sein, dass er zum einen nur in weiblichen Tieren auftritt und zum anderen vom Körper nicht kompensiert werden muss. Ein weiteres Indiz für eine leichte Veränderung in der Verdauung der Mäuse zeigte sich in den Regressionsdaten zwischen Futteraufnahme und Kotmenge bzw. aufgenommener Energie und Energie im Kot. Die erwartete Korrelation

zwischen der Aufnahme von Nahrung und der Abgabe von nicht verdauten Anteilen ließ sich vor allem bei den männlichen Tieren durch Koeffizienten größer 8,5 in beiden Mauslinien darstellen (Abbildung 4-14). Diese Korrelation war bei den weiblichen C57BL6/N-Mäusen etwas schlechter (Pearson Koeffizient ca. 8) aber immer noch aussagekräftig. Die Pearson Koeffizienten der weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse waren schlechter (0,6249 beim Vergleich der Energie und 0,6425 beim Vergleich der absoluten Mengen). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Verdauungssystem der weiblichen Knockout-Mäuse anders als das der männlichen Knockout-Mäuse auf den Verlust von *Slc10a5* reagiert hat.

5.3.6 Unterschiede in den Gallensäureprofil von *Slc10a5*^{-/-} Knockout- und *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Mäusen

Am Ende der sechsmonatigen Beobachtungsphase der Mäuse sollte der Gallensäurestoffwechsel der *Slc10a5*^{-/-} Knockout Maus unter Standardfütterungsbedingungen detailliert betrachtet werden. Grund dafür waren die Ergebnisse von Aretz (2015), die einen massiven induzierbaren Phänotyp dieser Mauslinie zeigten und die Vermutung aufkommen ließen, dass bei einer so starken Auswirkung des Gen-Knockouts unter cholestatischen Bedingungen ein Phänotyp in abgeschwächter Form auch ohne Fütterung von Cholsäure der Mäuse zu finden sein muss. Außerdem sollten in der vorliegenden Arbeit beide Geschlechter untersucht werden. Alle Proben wurden zu Beginn der 26. Lebenswoche der Mäuse postmortal entnommen. Diese Probenentnahme erfolgte immer zwischen 9.00 Uhr und 12.00 Uhr, da die Gallensäurehomöostase einem ausgeprägten, meist fütterungsbedingten, circadianen Rhythmus unterliegt und die Uhrzeit der Betrachtung von Gallensäureprofilen mitunter einen großen Unterschied machen kann (Govindarajan et al., 2016; Eggink et al., 2017; Zhang et al., 2018). Entnommen wurden nach cervikaler Dislokation zuerst systemisches Blut aus dem Herzen oder dem retrobulbären Venenplexus, Portalblut aus der Pfortader mit der Kanüle in Richtung Leber geführt, Gallenflüssigkeit durch Punktion der Gallenblase und Kotproben aus dem Enddarm. Durch diese Kombination aus Proben konnte der Enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren fast komplett abgedeckt werden. Lediglich Urinproben konnten aus versuchsbedingten Gründen nicht auf ihren Gehalt an Gallensäuren überprüft werden und stellen eine Lücke in der Betrachtung dar. Zukünftige Experimente sollten auf Grund der Expression von *Slc10a5* in den Nieren (Fernandes et al., 2007) nach Möglichkeit auch Urin analysieren, um diese Unsicherheit zu adressieren. Zusätzlich zur Gallensäureanalyse wurden Proben des Lebergewebes entnommen und für die Genexpressionsanalyse aufbereitet.

Im *Situs* der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse zeigten sich keinerlei Veränderungen der inneren Organe und des Darmkonvoluts. Dieser Befund entsprach den Ergebnissen von Aretz (2015), bei denen nur *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse unter Fütterung von 0,5% Cholsäure pathologische

Veränderungen des Darms zeigten, nicht jedoch die Tiere unter Standardfütterung. Diese Kompensation des Gen-Knockouts unter Standardfütterungsbedingungen ließ sich auch mikroskopisch in HE gefärbten histologischen Schnitten bestätigen. In den untersuchten Geweben zeigten sich keine Unterschiede zwischen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen und Wildtyp-Tieren.

Gallensäuren im Portalblut

Im Portalblut der Mäuse stellten sich keine signifikanten Unterschiede in den Gallensäurekonzentrationen zwischen weiblichen oder männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen und Wildtyp-Tieren dar. Die Standardabweichungen der Portalblutproben sind, wie die Daten in Tabelle 4-3 zeigen, im Vergleich zu den anderen Proben sehr hoch. Die Pfortader ist die erste Anlaufstelle für Gallensäuren, nachdem diese aus dem Darm resorbiert werden. Die Ausschüttung der Gallensäuren und damit auch die Gallensäurekonzentrationen im Portalblut sind daher stark abhängig vom Fütterungsstatus der Tiere. Postprandial werden wesentlich höhere Konzentrationen erzielt als im nüchternen Zustand (Angelin et al., 1982). Die Ursache für die hohen Standardabweichungen in den vorliegenden Daten war somit wahrscheinlich der Fütterungsstatus der Mäuse vor der Probenentnahme. Etwa 15 bis 60 Minuten nach der Futteraufnahme erreichen die Gallensäurekonzentrationen im Portalblut ein Maximum und fallen daraufhin wieder (Angelin et al., 1982). Zusätzlich sind sie noch tageszeitabhängigen Schwankungen unterworfen (Zhang et al., 2011). Wie bereits beschrieben, wurde die Tageszeit der Probenentnahme bei allen Mäusen gleich gewählt, um Schwankungen zu minimieren. Auch in diesem Punkt gäbe es für zukünftige Untersuchungen noch Verbesserungsmöglichkeiten. Um möglichst hohe Konzentrationen zu erzielen, müsste man die Proben zum Ende der Aktivitätsphase bzw. Dunkelphase der Mäuse gewinnen (Zhang et al., 2011). Um den weitaus größeren Einfluss des Fütterungsstatus der Mäuse zu minimieren, sollten in Zukunft die Mäuse vor der Probenentnahme zwei Stunden nüchtern gehalten werden, um dann einen auf das Körpergewicht angepassten Futterbolus per Gavage zu bekommen. Sechzig Minuten nach der Gabe des Bolus sollte dann die Entnahme der Proben erfolgen. Die Ergebnisse der Gallensäurekonzentrationen im Portalblut in der vorliegenden Arbeit lassen durch die hohen Standardabweichungen keine finale Aussage über Einflüsse des *Slc10a5*^{-/-}-Knockouts zu. Auch eine Bilanzierung, die in Bezug auf Konzentrationen aus anderen Abschnitten des Enterohepatischen Kreislaufs durchgeführt wurde, war durch die hohen Differenzen innerhalb der Gruppen nicht statistisch signifikant.

Gallensäuren in der Galle und Kotproben

Aus dem Portalblut gelangen die Gallensäuren in die Hepatozyten, werden dort rekonjugiert und erneut in die Gallenflüssigkeit abgegeben. Da die Gallenblase einen Zwischenspeicher für aus der Leber kommende Gallensäuren darstellt, waren die erreichten Konzentrationen in

diesem Abschnitt des Enterohepatischen Kreislaufs, wie zu erwarten, am höchsten. Konjugierte Gallensäuren erreichten hier Werte im millimolaren Bereich. Im Gegensatz zu den gemessenen Konzentrationen im Portalblut waren die Standardabweichungen bei den Werten in der Gallenblase niedriger und die Daten somit stabiler. Dies lag hauptsächlich daran, dass die Gallenblase durch die enorm hohen Gallensäurekonzentrationen und deren Akkumulation unabhängiger vom Fütterungszustand der Tiere ist. Die Galle wird unter normalen Bedingungen nicht komplett entleert, sondern es werden phasenweise kleinere Mengen in den Darm abgegeben (Howard et al., 1991). Das Portalblut hingegen ist, wie schon beschrieben, eine Momentaufnahme und ermöglicht keine Akkumulation. Die Gallenflüssigkeit entsprach in ihrer Zusammensetzung in diesem Versuch dem, was für Mäuse beschrieben ist: über 97% Taurin-konjugierte Gallensäuren und wenig unkonjugierte Formen (Falany et al., 1997; Alnouti et al., 2008). Bei den weiblichen Tieren traten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gallensäurekonzentrationen der *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen auf. Die männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse hingegen hatten im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren signifikant erhöhte Konzentrationen an Taurohyodeoxycholat und Taurodeoxycholat in der Gallenflüssigkeit.

Diese Ergebnisse passten zu den Gallensäuremessungen der Kotproben, denn auch hier zeigten sich ausschließlich bei den männlichen Mäusen signifikante Unterschiede in den Gallensäurekonzentrationen. Im Kot waren Hyodeoxycholat und Deoxycholat, also die dekonjugierten Formen der in der Galle erhöhten Gallensäuren, bei den männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren erhöht.

Gallensäuren im Blut des Körperkreislaufs

Neben den Hauptkompartimenten des Enterohepatischen Kreislaufs, Leber, Darm und Pfortader, wurden die Gallensäuren zudem im Serum des peripheren Körperkreislaufs gemessen. Die Gallensäurekonzentration sind zwar, genauso wie im Portalblut, abhängig vom Fütterungsstatus der Tiere, der Effekt ist in der Peripherie jedoch wesentlich geringer und tritt verzögert ein (Angelin et al., 1982). Deshalb stellen die Daten und Veränderungen der Gallensäureprofile, die aus dem peripheren Blut gewonnen werden konnten, eine Art Langzeiteffekt des *Slc10a5*^{-/-} Knockouts dar. Obwohl die beteiligten Transportsysteme sehr effektiv Gallensäuren aus dem Portalblut in die Hepatozyten aufnehmen, ist diese Absorption, genau wie die des ASBT in den Enterozyten, unvollständig (Angelin et al., 1982; Zhang et al., 2011). Bezogen auf die Daten, die in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, gab es einen Unterschied in der Konzentration der sekundären Gallensäure Deoxycholat. Die Deoxycholat-Konzentrationen waren im peripheren Blut der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse signifikant höher als in den Wildtyp-Tieren. Dieses Ergebnis passt ebenfalls zu den Erhöhungen von

Taurodeoxycholat in der Galle und Deoxycholat im Darm, da dies zu höheren Mengen an im Darm rückresorbiertem Deoxycholat führt und dadurch zu größeren Mengen dieser Gallensäure, die die Leber passieren und in das periphere Blut gelangen. Die Ergebnisse der Gallensäureanalyse ist in Abbildung 5-1 zusammengefasst.

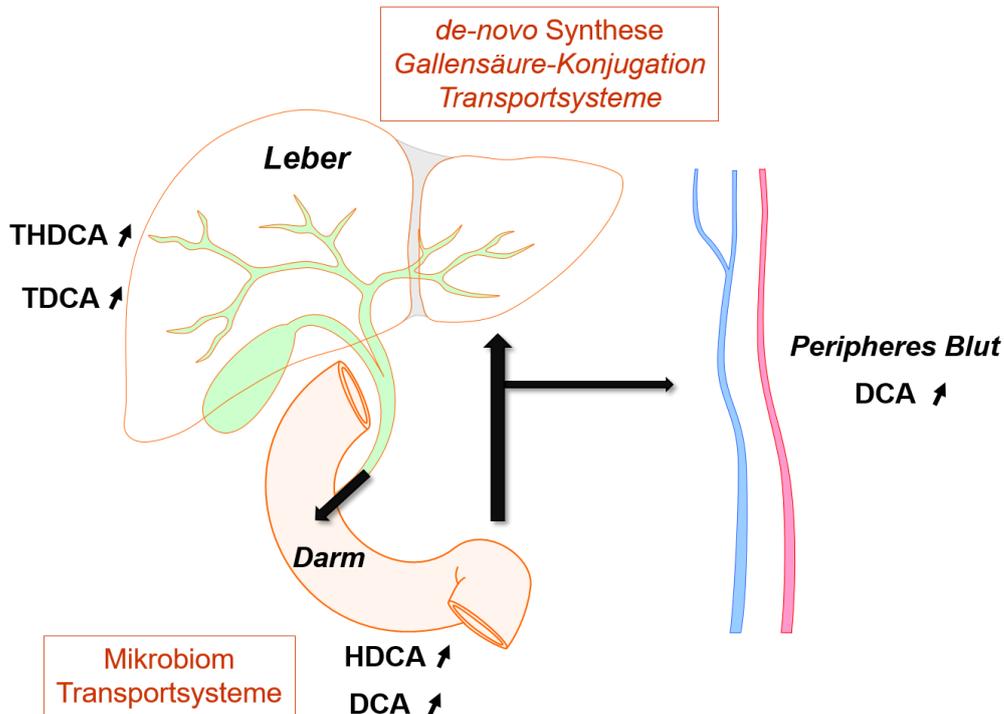


Abbildung 5-1: Veränderungen der Gallensäureprofile männlicher *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse im Gegensatz zu C57BL6N Wildtyp-Tieren

Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse der Gallensäurekonzentrationsmessungen in Darm, Galle und Blut der männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren. In der Gallenflüssigkeit waren die konjugierten sekundären Gallensäuren Taurohyodeoxycholat (THDCA) und Taurodeoxycholat (TDCA) erhöht, im Darm deren dekonjugierte Formen Hyodeoxycholat (HDCA) und Deoxycholat (DCA) und im peripheren Blut Deoxycholat. In Rot dargestellt sind die hauptsächlichsten Einflussfaktoren auf die Gallensäurekonzentration im jeweiligen Abschnitt.

5.3.7 Konjugations- und Hydroxylierungsstatus des Gallensäurepools von *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Bei der Betrachtung der Anteile verschiedener Gallensäuren und Gruppen von Gallensäuren werden die beschriebenen Veränderungen im Gallensäurepool der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus noch deutlicher. Die Trennung der Gallensäuren nach Konjugationsstatus in Taurin-, Glycin- und unkonjugierte Gallensäuren zeigt insgesamt nur geringe Unterschiede (Abbildung 4-20). Insgesamt werden durch diesen Vergleich historische Daten der Gallensäurekonjugation in Mäusen bestätigt. In der Galle liegen über 99% der Gallensäuren Taurin-konjugiert vor und im Kot über 90% unkonjugiert (Alnouti et al., 2008) Der *Slc10a5*-Knockout ändert an diesen physiologischen Verhältnissen nichts. Im peripheren Blut der männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse zeigt sich der bereits beschriebene signifikante Anstieg einiger unkonjugierter Gallensäuren in einem leichten Anstieg des gesamten Anteils unkonjugierter Gallensäuren. Bei den weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen hingegen sinkt der Anteil unkonjugierter Gallensäuren im Blut. Diese Verschiebung ist in den absoluten Konzentrationen jedoch auf Grund hoher Standardabweichungen nicht signifikant. Eine weitere Möglichkeit der Gruppierung der Gallensäuren ist die Zusammenfassung der Konzentrationen jeder „Kerngallensäure“ unabhängig von ihrem Konjugationsstatus. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich des Hydroxylierungsstatus der Gallensäuren. In Abbildung 4-21 zeigt sich deutlich der Fokus der Verschiebungen im Gallensäurepool der männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse auf Deoxycholat. Sowohl in der Galle und dem peripheren Blut als auch dem Kot steigt der prozentuale Anteil von Deoxycholat an. Auf dieses Ergebnis wird im Zusammenhang mit der Rehydroxylierung im weiteren Verlauf der Diskussion noch einmal eingegangen.

5.3.8 Geschlechtsunterschiede der Gallensäureveränderungen der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus bieten den ersten Datensatz, der eine geschlechtsabhängige Betrachtung der Auswirkungen des Verlusts von SLC10A5 zulassen. Diese Daten zeigen, wie in vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben, signifikante Verschiebungen der Konzentrationen von Deoxycholat, Hyodeoxycholat und deren Taurinkonjugaten ausschließlich in männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen. In den weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Tieren ist für die gleichen Gallensäuren sogar ein entgegengesetzter Trend zu beobachten. Auf der anderen Seite zeigte sich nur bei den weiblichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Tieren eine signifikant gesteigerte Kotmenge, die, wie in Kapitel 5.3.5 beschrieben, auf Verschiebungen der mikrobiellen Flora oder weiteren Einflüssen des Gen-Knockouts hinweisen könnte. Die Frage, warum sich der Verlust von SLC10A5 in männlichen und weiblichen Mäusen so unterschiedlich äußert, kann, basierend auf den erhobenen Daten, nicht final geklärt werden. Hier wäre eine Untersuchung der Mäuse

unter Fütterung von Cholsäure, ähnlich wie in der Arbeit von Aretz (2015), hilfreich, um die Reaktion des Gallensäurestoffwechsel weiblicher *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse unter Extrembedingungen zu untersuchen.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Funktion und Expression von Genen des Energie- und Gallensäuremetabolismus sind ausführlich beschrieben (Geer und Shen, 2009; Sheng et al., 2017). Diese Unterschiede greifen bereits auf der Ebene der Regulation des Gallensäurestoffwechsels beim Kernrezeptor FXR (Sheng et al., 2017). *Fxr*^{-/-} Knockout-Mäuse beider Geschlechter wurden auf eine fettreiche Diät gesetzt und die Zusammensetzung des Mikrobioms sowie Expression verschiedener Gene sowie Leberparameter untersucht. Männliche *Fxr*^{-/-} Knockout-Mäuse entwickelten eine wesentlich massivere Fettleber als weibliche Tiere. Zusätzlich wurden weitere FXR-abhängige Gene geschlechtsspezifisch unterschiedlich reguliert und auch die Verschiebungen der Bakterienprofile des Mikrobioms zeigten unterschiedliche Veränderungen in männlichen und weiblichen Mäusen. Alle Veränderungen ließen sich dabei auf eine geschlechtsspezifische Reaktion auf den Verlust von FXR zurückführen (Sheng et al., 2017). Ein weiteres Beispiel für eine geschlechtsspezifische Expression und Regulation ist NTCP. Für NTCP wurde eine Abhängigkeit für Geschlechtshormone gezeigt. Östradiol führt zu einer Verringerung der Expression von *Ntcp* in männlichen Ratten, eine Ovariectomie führt in weiblichen Ratten zu einer gesteigerten *Ntcp*-Expression (Simon et al., 2004). Auch OATPs als Gallensäureaufnahme-transporter zeigen geschlechtsspezifische Regulations- und Expressionsmuster (Rost et al., 2005). Diese Vergleiche zeigen, dass der Lebermetabolismus, die Gallensäurehomöostase und die hormonabhängige Regulation involvierter Gene stark abhängig vom Geschlecht sind und somit eine effektivere Kompensation des Verlusts von *Slc10a5* in weiblichen Mäusen nicht verwunderlich ist. Basierend auf den genannten Unterschieden im Gallensäurestoffwechsel männlicher und weiblicher Säugetiere wurde entschieden, dass in dieser Arbeit kein statistischer Vergleich zwischen diesen Gruppen gezogen wird. Die Ergebnisse solcher Vergleiche wären basierend auf den hier erhobenen Daten und der Stichprobenzahl schwer zu interpretieren und in ihrer Aussagekraft fragwürdig.

5.4 Mögliche Ursachen der Unterschiede im Gallensäurepool von männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen

Die Ursache für erhöhte Konzentrationen Taurodeoxycholat und Taurohyodeoxycholat in der Galle, erhöhte Konzentrationen Deoxycholat im Kot und dem peripheren Blut und erhöhte Konzentrationen Hyodeoxycholat im Kot können durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen die Transportsysteme, die am Enterohepatischen Kreislauf beteiligt sind, die *de novo* Synthese von Gallensäuren, Konjugations- und Umbauprozesse von Gallensäuren in der Leber und die mikrobielle Darmflora. Auch denkbar wäre natürlich eine

Kombination dieser Faktoren. Die einzelnen Möglichkeiten sollen im Folgenden näher beschrieben und in den Kontext eines Verlusts des *Slc10a5*-Gens der Maus gestellt werden.

5.4.1 Gallensäuren und das Mikrobiom

Die durch das genetische Defizit von *Slc10a5* ausgelösten Veränderungen in den Gallensäureprofilen der Mäuse beschränken sich auf die zwei Gallensäuren Deoxycholat und Hyodeoxycholat sowie deren Taurin-Konjugate. Die sekundären Gallensäuren Deoxycholat und Hyodeoxycholat, die durch bakterielle Modifikationen im Darm entstehen, basieren nicht auf der gleichen primären Gallensäure. Deoxycholat entsteht durch bakterielle 7 α -Dehydroxylierung von Cholat. Entsprechende Aktivitäten konnten für Bakterien der Gattungen *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* und *Lactobazillus* gemessen werden (Björkhem et al., 1989; Hylemon et al., 1991). Das Ausgangsmolekül der bakteriellen Bildung von Hyodeoxycholat hingegen ist β -Muricholat. Diese Umwandlung wird durch 7 β -Dehydroxylierung und die Epimerisierung der Hydroxylgruppe an Position 6 von β zu α erzielt. Dabei ist denkbar, dass die 7 β -Hydroxylgruppe zuerst in die α -Position epimerisiert und dann von den oben bereits genannten Bakterienspezies dehydroxyliert wird, da eine 7 α -Dehydroxylierungsaktivität häufiger bei Bakterien zu beobachten ist als die 7 β -Dehydroxylierung (Eyssen et al., 1999). Es gibt jedoch auch Bakterien der Gattungen *Eubacterium* und *Clostridium*, die in der Lage sind, eine 7 β -Dehydroxylierung vorzunehmen (Eyssen et al., 1999). Eine enzymatische Umwandlung von Deoxycholat zu Hyodeoxycholat oder anders herum ist bislang nicht beschrieben.

In den letzten Jahrzehnten wurde, bedingt durch die rasante technische Entwicklung und den medizinischen Fortschritt, der massive Einfluss der mikrobiellen Besiedlung des Darms auf den Gallensäurestoffwechsel immer deutlicher. Diese Symbiose beeinflusst sowohl die physiologische Funktion des Darms und die effektive Verwertung von Nahrung, als auch die Entstehung von Krankheiten und metabolischen Ungleichgewichten (Turnbaugh et al., 2007; Human microbiome project, 2012; Ursell et al., 2012). Dementsprechend groß ist auch der Einfluss der bakteriellen Zusammensetzung des Mikrobioms auf die Zusammensetzung des Gallensäurepools und den Gallensäuremetabolismus (Ridlon et al., 2014; Ramírez-Pérez et al., 2017). Durch das *human genome project* wurden ungefähr 20000 Gene aufgedeckt, die für Proteine im menschlichen Organismus codieren (Turnbaugh et al., 2007). Im menschlichen Mikrobiom wurden bislang mehr als 3,3 Millionen nicht redundante Gene aufgedeckt (Qin et al., 2010). Dieser Vergleich zeigt die unglaubliche Komplexität der Variation innerhalb der mikrobiellen Population: Zwei Menschen stimmen in 99,9% ihres Genoms überein (Wheeler et al., 2008), unterscheiden sich gleichzeitig aber zu 80-90% in der Zusammensetzung ihres Mikrobioms (Turnbaugh et al., 2009). Die Unterschiede in den Gallensäurekonzentrationen der männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse und Wildtyp-Tiere könnten also, basierend auf

dieser hohen Variabilität, auf Unterschieden in den Bakterienspezies beruhen, welche die Dehydroxylierung von Cholat und β -Muricholat vermitteln. Bei den Mäusen, die in der Arbeit von Aretz (2015) zur Untersuchung des Gen-Knockouts verwendet wurden, ist dieser Einfluss vermutlich noch größer gewesen als bei den Mäusen in dieser Arbeit. Die C57BL6N-Tiere wurden direkt vom Züchter bezogen, die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse im eigenen Tierstall gezüchtet. Die Umwelteinflüsse unterschiedlicher Tierhaltungen, die für eine Individualisierung des Mikrobioms bezogen auf den Standort sorgen, könnten so auch zu einem Teil der Veränderungen in der Arbeit von Aretz (2015) gesorgt haben (Parker et al., 2018). Auf der anderen Seite ist es unwahrscheinlich, dass die massive Beeinträchtigung der Konjugation von Gallensäuren und die damit verbundenen pathologischen Veränderungen des Darmkonvoluts allein auf Unterschieden der mikrobiellen Flora beruhen, da die Diskrepanz zwischen diesem Phänotyp und den Wildtyp-Kontrolltieren mit einer kompletten Kompensation der großen Mengen Cholsäure sehr groß ist. Eine endgültige Aussage darüber wäre nur durch eine Mikrobiomanalyse möglich. Allerdings ist es durch die gegenseitige Beeinflussung von Gallensäurestoffwechsel und Mikrobiom nicht einfach zu klären, welche Veränderung jeweils zuerst eingetreten ist. Für die vorliegende Arbeit wurde daher ein Augenmerk auf eine Zucht der Knockout- und Wildtyp-Tiere in der gleichen Umgebung gelegt. Sowohl die Elterntiere als auch die Tiere, mit denen die Untersuchungen durchgeführt wurden, wurden im gleichen Raum gehalten, nicht gesondert behandelt und den gleichen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Dieses Vorgehen sollte nach Möglichkeit die Variabilität des Mikrobioms eingrenzen. Von einer Zucht heterozygoter Tiere wurde aus Tierschutzgründen im Sinne des 3R-Prinzips abgesehen. Eine solche Zucht hätte zwar ermöglichen können, dass die Knockout- und Wildtyp Tiere Wurfgeschwister sind, würde aber auch zu einer sehr großen Anzahl an Tieren führen, die auf Grund eines heterozygoten Genotyps keine weitere Verwendung in der Erforschung von SLC10A5 hätten finden können. Die Möglichkeit, dass die in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede in den Konzentrationen sekundärer Gallensäuren in der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus auf Unterschiede des Mikrobioms zurückzuführen sind, besteht also. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch keine Sequenzierung des Mikrobioms durchgeführt werden.

Auf der anderen Seite spricht jedoch auch viel dafür, dass die gezeigten Ergebnisse auf den veränderten Genotyp der Mäuse zurückzuführen sind. Dazu zählen die antimikrobiellen Eigenschaften von Deoxycholat. Diese sind etwa um den Faktor 10 höher als die antimikrobiellen Eigenschaften von Cholat und würden zusammen mit der FXR-vermittelten Bildung von antimikrobiellen Peptiden zu einer lebensfeindlicheren Umgebung für Bakterien führen (Begley et al., 2005; Inagaki et al., 2006). Dass dieser Effekt durch die Bakterien alleine ausgelöst wird, die sich damit selber behindern würden, ist unwahrscheinlicher als ein genetischer Einfluss von *Slc10a5*. Zusätzlich kann die Verschiebung der Zusammensetzung des Mikrobioms auch ein sekundärer Effekt sein. Wenn die höhere Menge konjugierter

sekundärer Gallensäuren in der Galle ihre Ursache im Gallensäurestoffwechsel der Hepatozyten hat, könnte das zu einem Selektionsdruck auf das Mikrobiom führen. Bakterienspezies, die Taurodeoxycholat und Taurohyodeoxycholat nutzen und verarbeiten können, würden dadurch bevorzugt und eine solche sekundäre Verschiebung der Zusammensetzung des Mikrobioms könnte entstehen. Daher wird der genetische Einfluss von SLC10A5 in dieser Arbeit als Hauptfaktor der Veränderungen in der Konzentration von Gallensäuren betrachtet. Zukünftige Versuche mit der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus sollten den Einfluss des Mikrobioms auf die Ergebnisse der Mauslinie durch die Sequenzierung des Mikrobioms untersuchen, um dieser Unsicherheit auf den Grund zu gehen. Es wird durch die komplexe und unmittelbare Interaktion von Wirtsorganismus und Mikrobiom jedoch schwer bleiben, dieses „Henne-Ei-Problem“ zu lösen.

5.4.2 De novo Synthese von Gallensäuren

Die erste Möglichkeit, wie es zu einem erhöhten Auftreten von sekundären Gallensäuren kommen kann, ist ein Eingriff in die *de novo* Synthese von Cholat, Chenodeoxycholat bzw. den Muricholsäuren in der Maus und einem daraus resultierenden Anstieg sekundärer Gallensäurespezies. Voraussetzung dafür ist jedoch eine erhöhte Menge unkonjugierter primärer Gallensäuren, da Taurocholat bzw. Tauromuricholat effektiv im Ileum von ASBT resorbiert werden. Außerdem würden die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Gallensäuresynthese eine gesteigerte Expression aufweisen. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen jedoch, dass diese Enzyme in den männlichen Mäusen, in denen auch die veränderten Gallensäurewerte zu messen waren, nicht signifikant verändert sind. Allerdings ist diese erwartete erhöhte Expression dieser Enzyme in diesem Fall selbstlimitierend. Deoxycholat ist neben Chenodeoxycholat einer der stärksten Agonisten des Kernrezeptors FXR (Sepe et al., 2016). Eine gesteigerte Menge an Deoxycholat bedeutet also auch eine Steigerung der FXR Aktivität und eine damit verbundene Senkung der Expression der Enzyme der Gallensäuresynthese (Zollner et al., 2006). FXR jedoch wies in der Genexpressionsanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen und Wildtyp-Tieren auf. Ein Einfluss von SLC10A5 auf die *de novo* Synthese von Gallensäuren durch SLC10A5 ist somit in dieser Arbeit mit Mäusen unter Standardhaltungsbedingungen sehr unwahrscheinlich. Dafür spricht vor allem, dass neu synthetisierte Gallensäuren unter physiologischen Bedingungen nur einen Anteil von etwa 5% am gesamten Gallensäurepool ausmachen (Dawson et al., 2009) und somit eine gesteigerte *de novo* Synthese nicht zu signifikant erhöhten Mengen an Deoxycholat oder Hyodeoxycholat im Gallensäurepool führen würden, zumal eine massiv gesteigerte Verfügbarkeit an primären Gallensäuren, wie von Aretz (2015) gezeigt wurde, in Wildtyp-Mäusen ohne Probleme durch Konjugation entgiftet werden konnte.

5.4.3 Transporter des Enterohepatischen Kreislaufs

Als weitere Möglichkeit für Verschiebungen des Gallensäureprofils der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse kommen Verschiebungen in der Funktionalität der Transportsysteme des Enterohepatischen Kreislaufs in Frage. SLC10A5 könnte als Co-Faktor, eigenständiger Transporter oder auch Bindungsprotein Einfluss nehmen. Um einen Vergleich zwischen der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus in Bezug auf andere Transporter herzustellen, sollen in der Literatur beschriebene Knockout Maus Modelle dieser Transporter herangezogen werden.

Vergleich mit den *Ntcp (Slc10a1*^{-/-}) und *Asbt (Slc10a2*^{-/-}) Mauslinien

NTCP ist maßgeblich an der Natrium-getriebenen Aufnahme von konjugierten Gallensäuren aus dem Pfortaderblut an der Basalmembran der Hepatozyten und somit der Aufrechterhaltung des Enterohepatischen Kreislaufs beteiligt (Kosters und Dawson, 2015). *In vitro* zeigten primäre Hepatozyten, isoliert aus Lebern von *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Mäusen, keinerlei Transportaktivität für die entsprechenden Substrate und die Vermutung lag nahe, dass der Knockout *in vivo* erhöhte Serum-Gallensäurekonzentrationen durch Unterbrechung des Enterohepatischen Kreislaufs in der Leber mit sich bringen würde. Überraschenderweise waren bei etwa 70% der *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Mäuse die Gallensäurekonzentrationen im Serum im Normalbereich. Nur die übrige Subpopulation an Tieren zeigte, unabhängig vom Geschlecht oder anderer Parameter, erhöhte Konzentrationen konjugierter Gallensäuren im Blut. Äußerlich waren alle Mäuse, bis auf Verzögerungen in der Gewichtsentwicklung einiger Mäuse, unauffällig (Kosters und Dawson, 2015; Slijepcevic et al., 2015).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sogar der Verlust eines hochaktiven Membrantransporters wie *Ntcp* bis zum Ausbleiben eines Phänotyps kompensiert werden kann. Ursache für diese Kompensation sind die hepatozellulären Transporter der SLCO-Familie (*Oatp1a1*, *Oatp1a4*, *Oatp1b2*, *Oatp2b1*), welche unter physiologischen Bedingungen unkonjugierte Gallensäuren in die Leberzellen transportieren können (Hagenbuch und Meier, 2004; Kosters und Dawson, 2015; Slijepcevic et al., 2015). Die Mäuse der *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Gruppe mit erhöhten Gallensäurekonzentrationen im Serum zeigen allerdings auch, dass die Aufnahme von Gallensäuren in die Leber in den *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Mäusen eine Kapazitätsgrenze erreicht hat und nicht in jedem Individuum eine komplette Kompensation gewährleistet werden kann. Im Vergleich der *Slc10a1*^{-/-} und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse finden sich viele Unterschiede, aber auch einige Parallelen. Beiden gleich scheint eine effektive Kompensation des Verlusts eines Proteins im Organismus durch entsprechende Redundanzsysteme zu sein. Der größte Unterschied zwischen den Mauslinien ist die Art der erhöhten Gallensäuren. Bei der *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Maus steigen die Konzentrationen eines breiten Spektrums konjugierter Gallensäuren im Serum an, bei der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus hingegen ist es nur die sekundäre Gallensäure Deoxycholat. Dies spricht dafür, dass NTCP und SLC10A5 zwar im

gleichen Gewebe exprimiert werden, aber nicht in die Weiterverarbeitung der gleichen Klasse von Gallensäuren eingreifen. Ein weiterer Unterschied zwischen den Mauslinien ist das Ausmaß der Gallensäureerhöhungen im Serum. Bei der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus sind die Deoxycholat-Konzentrationen etwa um den Faktor 2 erhöht, wohingegen bei den *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Mäusen die Gesamtgallensäurekonzentration im Serum jenseits der 1000 µM Marke liegt (1-20 µM sind normal) (Slijepcevic et al., 2015). Dies spricht im Falle des *Slc10a5*^{-/-} Knockouts für eine Akkumulation kleiner Mengen Deoxycholat über einen längeren Zeitraum oder einen sehr geringen akuten Effekt.

Der zweite Transporter aus der SLC10-Familie, der den Erhalt des Enterohepatischen Kreislaufs sicherstellt, ist ASBT. ASBT transportiert Gallensäuren über die apikale Membran der Enterozyten im terminalen Ileum und verhindert somit den Verlust der Gallensäuren über den Kot (Shneider, 2001; Dawson et al., 2009). Dieser vermutete Verlust bestätigte sich bereits bei humanen Patienten mit einem seltenen hereditären *SLC10A2*-Defekt. Symptome sind Malabsorption von Gallensäuren, unstillbare Säuglingsdurchfälle und Wachstumsstörungen (Dawson et al., 2003). Äußerlich zeigt die *Slc10a2*^{-/-} Knockout-Maus, genau wie *Slc10a1*^{-/-} und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse sowie im Gegensatz zu den humanen Patienten, keine Hinweise auf den genetischen Verlust eines Proteins, bis auf vereinzelte Verzögerungen in der Gewichtsentwicklung junger Tiere (Dawson et al., 2003; Aretz, 2015; Slijepcevic et al., 2015). Bei genauerer Betrachtung der Gallensäureprofile im Kot bestätigte sich die Vermutung eines erhöhten Verlusts von Gallensäuren, gepaart mit einer erhöhten Ausscheidung von Lipiden über den Darm. Die Gallensäurekonzentrationen im Kot waren dabei um das bis zu 24-fache erhöht. Die Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit verschob sich dabei drastisch zugunsten von Taurocholat. Als Kompensationsmechanismen des Gallensäureverlusts zeigten sich eine erhöhte *de novo* Synthese von Gallensäuren und das Auftreten von größeren Mengen unkonjugierter Gallensäuren, hauptsächlich Deoxycholat, im Darm (Dawson et al., 2003).

Im Vergleich von *Slc10a2*^{-/-} und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen fallen die Parallelen in der Verschiebung der Gallensäurekonzentrationen im Kot auf. In beiden Knockout Mauslinien gewinnt der Gallensäurepool, zumindest bei der Betrachtung der Gallensäuremetaboliten im Kot, insgesamt an Hydrophobizität, bedingt durch die Verschiebung von β-Muricholat zu Taurocholat (*Slc10a2*-Knockout) und dem erhöhten Anfallen von Deoxycholat (*Slc10a2*- und *Slc10a5*-Knockout). Hauptursache hierfür dürfte vor allem Deoxycholat sein. Die Ursache dafür scheint in der *Slc10a2*^{-/-} Knockout-Maus jedoch klar die fehlerhafte Reabsorption konjugierter Gallensäuren zu sein, die dann bakteriell zu sekundären Gallensäuren dekonjugiert werden, wohingegen in der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus kein direkter Hinweis auf die Herkunft der höheren Mengen Deoxycholat zu finden ist. Wie auch in der *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Maus muss aber auch dieser Vergleich mit Vorsicht gezogen werden. Im Gegensatz zu den Verschiebungen im Gallensäureprofil der *Slc10a2*^{-/-} Knockout-Mäuse sind die

Verschiebungen in den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen zwar signifikant, aber wesentlich geringer. Umso erstaunlicher bleibt es, dass keine der Mauslinien einen offensichtlichen äußeren Phänotyp preisgibt.

Betrachtet man diese drei familiär verknüpften SLC10-Proteine gemeinsam, so fällt auf, dass die Mechanismen eines Genknockouts von *Slc10a1* und *Slc10a2* jeweils spezifisch im jeweiligen Expressionsgewebe zum Tragen kommen. Der Verlust von SLC10A5 hingegen zeigt sowohl in Galle und Darm als auch dem peripheren Blut Veränderungen, was für eine organübergreifende Funktion von SLC10A5 zusammen mit den daraus resultierenden Veränderungen spricht.

Vergleich mit der *Slco1a/1b*^{-/-} Mauslinie

Die Aufnahme von Gallensäuren über die basolaterale Membran von Hepatozyten erfolgt wie bereits beschrieben für konjugierte Gallensäuren unter physiologischen Umständen über NTCP (Monte et al., 2009). Unkonjugierte Gallensäuren hingegen gelangen entweder passiv oder durch Natrium-unabhängigen Transport von Mitgliedern der OATP1-(Mensch) / Oatp1-(Tier)-Subfamilie in Leberzellen (Hagenbuch und Meier, 2004). OATP1A/Oatp1a- und OATP1B/Oatp1b-Proteine transportieren nicht nur unkonjugierte Gallensäuren, sondern ein breites Spektrum an Xenobiotika, Steroid- und Thyroidhormonen und deren Konjugate sowie Bilirubin in Leber, Dünndarm und den Nieren (Hagenbuch und Meier, 2004; Niemi, 2007).

Um das komplexe Zusammenspiel und Funktionsspektrum dieser Transporter zu untersuchen, wurde die *Slco1a/1b*^{-/-} Knockout-Mauslinie generiert. Dieser Mauslinie fehlen alle fünf Leberrelevanten *Slco1a*- und *Slco1b*-Gene, wodurch Kompensations- und Redundanzmechanismen, die innerhalb dieser Genfamilie auftreten könnten, minimiert werden (van de Steeg et al., 2010). Die *Slco1a/1b*^{-/-} Knockout-Mäuse waren vital und zeigten keinen offensichtlichen pathologischen Phänotyp, außer einer sich in Gelbsucht äußernden Hyperbilirubinämie. Neben den gesteigerten Bilirubin Konzentrationen im Serum waren auch die Konzentrationen unkonjugierter Gallensäuren um das etwa 13-fache erhöht (van de Steeg et al., 2010).

Wie auch in der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus zu beobachten, sind die gesteigerten Konzentrationen unkonjugierter Gallensäuren im Serum der *Slco1a/1b*^{-/-} Knockout-Mäuse, bezogen auf den gesamten Gallensäurepool, verschwindend gering. Dennoch fällt hier, bei isolierter Betrachtung der Auswirkungen auf das periphere Blut, die starke Parallelität der beiden Mauslinien auf. Größter Unterschied ist gleichzeitig das Spektrum der erhöhten Gallensäuren, mit einer sehr spezifischen Erhöhung einer einzelnen Gallensäure (DCA) im Serum der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus gegenüber der gleichmäßigen Erhöhung aller unkonjugierten Gallensäurespezies in der *Slco1a/1b*^{-/-} Knockout-Maus (van de Steeg et al., 2010). Auch hier spricht vieles dafür, dass die Hepatozyten der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

überfordert sind mit der Aufnahme, Prozessierung oder Elimination von größeren Mengen Deoxycholat bzw. bei der Betrachtung des gesamten Enterohepatischen Kreislaufs auch von Hyodeoxycholat.

Vergleich mit der *Abcb11*^{-/-} Knockout-Maus und der *Osta*^{-/-} Knockout-Maus

In der apikalen Membran von Hepatozyten ist hauptsächlich der ABC-Transporter BSEP verantwortlich für den Efflux von Gallensäuren in die Galle (Gerloff et al., 1998). Sein Gegenstück in Enterozyten ist der heterodimere Transporter Ost α /Ost β , der den Gallensäuretransport über die Basalmembran in das Pfortaderblut vermittelt (Ballatori et al., 2005). In der *Abcb11*^{-/-} Knockout-Maus manifestiert sich eine progressive Cholestase durch intrahepatische Akkumulation von Gallensäuren zusammen mit einer breiten Verschiebung der Genregulation des Lebermetabolismus (Zhang et al., 2012). Die *Osta*^{-/-} Knockout-Maus hingegen führt zu einer Verringerung des gesamten Gallensäurepools durch eine Akkumulation von Gallensäuren in den Enterozyten und eine dadurch bedingte, FXR-vermittelte Herabregulierung der Gallensäuresynthese (Soroka et al., 2010). In beiden Knockoutmauslinien entsprechen die Änderungen der intrazellulären Gallensäureprofile nicht den Veränderungen, den der Knockout von *Slc10a5* in Bezug auf Deoxycholat und Hyodeoxycholat mit sich führt. Sowohl BSEP als auch OST α /OST β transportieren ein sehr breites Spektrum an Gallensäuren und die gezeigten Effekte in den Knockout Mauslinien beschränken sich nicht auf einzelne Gallensäuren. Somit ist davon auszugehen, dass die Funktion von SLC10A5 in keiner Relation zum Gallensäure-Efflux in Hepatozyten oder Enterozyten steht.

Der Vergleich der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus mit anderen Mauslinien lässt in keinem Fall einen eindeutigen Rückschluss auf die Funktionsweise des Proteins zu. Die gezeigten Erhöhungen der Konzentrationen von Deoxycholat und Hyodeoxycholat weisen auf einen sehr speziellen Mechanismus hin. Die beschriebenen Knockout-Mauslinien der Transportsysteme des Enterohepatischen Kreislaufs zeigen immer einen Einfluss auf ein breiteres Feld an Gallensäuren. Der interessanteste Vergleich gelingt mit der *Slc10a1*^{-/-} Knockout-Maus und der *Oatp1a/1b*^{-/-} Knockout-Maus. Bei diesen beiden Mauslinien zeigt sich, dass beim Verlust eines dieser Gene eine sehr effektive Kompensation in Kraft tritt, die dafür sorgt, dass der jeweilige Knockout maskiert werden kann. Umso erstaunlicher ist es in der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus, dass trotz voller Funktionsfähigkeit dieser Transportsysteme in der Leber eine signifikant höhere Menge Deoxycholat die Leber passieren kann und in die Peripherie gelangt. Im Detail scheint der Einfluss von SLC10A5 unter physiologischen Bedingungen stark genug, um Kompensationsmechanismen an ihre Grenzen zu bringen.

5.4.4 Einfluss auf die Konjugation von Gallensäuren in der Leber

Die Schlussfolgerung der Arbeit von Aretz (2015) in Bezug auf die Funktion von SLC10A5 war eine Beteiligung an der intrahepatischen Konjugation von Gallensäuren. Grundlage für diese Hypothese lieferten die Ergebnisse der ersten Gallensäureuntersuchungen in der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus unter Fütterung von 0,5% Cholsäure. Die Mäuse wiesen eine massive Verschiebung des Gallensäurepools zu Gunsten unkonjugierter Gallensäuren auf (Aretz, 2015). Im Folgenden soll ein Konjugationsdefizit basierend auf den in dieser Arbeit gezeigten Verschiebungen der Gallensäureprofile männlicher *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse diskutiert werden.

Bei der Konjugation muss zwischen *de novo* synthetisierten Gallensäuren und der Konjugation rezirkulierender Gallensäuren unterschieden werden, da diese Vorgänge innerhalb der Zellen in unterschiedlichen Kompartimenten stattfinden (Hubbard et al., 2006; Falcon et al., 2010). Eine fehlerhafte Konjugation von neu synthetisierten Gallensäuren würde sich auf die primären Gallensäuren Cholat und Chenodeoxycholat beschränken und zu höheren Konzentrationen dieser Gallensäuren im Gallensäurepool führen. Dies konnte in den *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen bislang nicht beobachtet werden. Allerdings macht die Menge an neu synthetisierten Gallensäuren nur etwa 5% der Gesamtmenge zirkulierender Gallensäuren aus (Hofmann und Roda, 1984), weshalb ein Defizit an dieser Stelle möglicherweise nicht sichtbar wäre. Klären ließe sich das nur durch die Bestimmung von Gallensäurevorläufern wie Dihydroxy- und Trihydroxykoprostan säure, welche bei einer fehlerhaften CoA-Aktivierung im ER erhöht wären, oder den nachgeschalteten Vorläufermolekülen, die im Peroxisom synthetisiert werden. Dagegen spricht allerdings, dass in den Arbeiten von Pellicoro (2008), Aretz (2015) und der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf eine peroxisomale Lokalisation von SLC10A5 gefunden werden konnte.

Ein Beispiel für eine effektive Kompensation an dieser Stelle liefert die *Slc27a2*^{-/-} Knockout-Maus, welche kein FATP2 exprimiert. Für FATP2 wird eine Thioesteraseaktivität für die Gallensäurevorläufer Dihydroxy- und Trihydroxykoprostan säure beschrieben. Neben den Effekten auf den Fettsäurestoffwechsel, die durch die Funktion von FATP2 als Transporter dieser Fettsäuren zu erklären sind, zeigten sich keinerlei Unterschiede in den Gallensäureprofilen und dem Cholesterinstoffwechsel der Mäuse (Falcon et al., 2010). Dies liegt vermutlich an der Überschneidung der Expressionsmuster von FATP2 und FATP5 in der Leber. FATP2 ist in Leberzellen in den Peroxisomen und der Plasmamembran lokalisiert (Falcon et al., 2010), FATP5 in der Plasmamembran und dem ER (Steinberg et al., 2000). Durch diese Überschneidung wird das Fehlen von FATP2 in der Knockout Mauslinie durch FATP5 komplett kompensiert (Falcon et al., 2010).

Im Gegensatz dazu lässt sich in *Slc27a5*^{-/-} Knockout-Mäusen, welche kein FATP5 exprimieren, ein wesentlich drastischerer Einfluss auf die Gallensäurekonjugation darstellen. In dieser Mauslinie zeigt sich unter Standardfütterungsbedingungen eine Umkehr des physiologischen Verhältnisses zwischen konjugierten und unkonjugierten Gallensäuren. In den *Slc27a5*^{-/-} Knockout-Mäusen liegen 83% der Gallensäuren unkonjugiert vor und nur 17% in ihrer konjugierten Form (Hubbard et al., 2006). Gleichzeitig wurde festgestellt, dass die Konjugation *de novo* synthetisierter Gallensäuren unbeeinträchtigt bleibt, wodurch der Fokus der Funktion von FATP5 eindeutig auf rezirkulierende Gallensäuren gelegt werden kann (Hubbard et al., 2006).

Am interessantesten ist aber die Betrachtung von Deoxycholat und Hyodeoxycholat, den Gallensäuren, die in der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus unter Standardfütterungsbedingungen signifikant höher waren als in Kontrolltieren. Deoxycholat und Hyodeoxycholat liegen in der *Slc27a5*^{-/-} Knockout-Maus ausschließlich unkonjugiert vor und scheinen somit in ihrer Konjugation, anders als andere Gallensäuren, komplett abhängig von der Aktivierung durch FATP5 zu sein. Allerdings war sowohl die Größe des gesamten Gallensäurepools als auch die absolute Menge an Deoxycholat und Hyodeoxycholat identisch zwischen Knockout und Wildtyp Mäusen (Hubbard et al., 2006). Bei einem Vergleich der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus und der *Slc27a5*^{-/-} Knockout-Maus fallen somit in Bezug auf die sekundären Gallensäuren Deoxycholat und Hyodeoxycholat starke Überschneidungen auf, die darauf hindeuten könnten, dass beide Proteine möglicherweise in ähnliche Schritte der Konjugation rezirkulierender Gallensäuren eingreifen. Basierend auf den Ergebnissen aus der Kolo-kalisation in der Zellkultur, die eine Überlagerung von Endoplasmatischem Retikulum und SLC10A5 von 39,58% gezeigt haben (Abbildung 4-4), überschneiden sich die intrazellulären Expressionsprofile von SLC10A5 und FATP5 (Steinberg et al., 2000; Fernandes et al., 2007) somit im ER von Leberzellen. In Abbildung 5-2 ist die Konjugation rezirkulierender Gallensäuren und eine mögliche Beteiligung von SLC10A5 schematisch dargestellt:

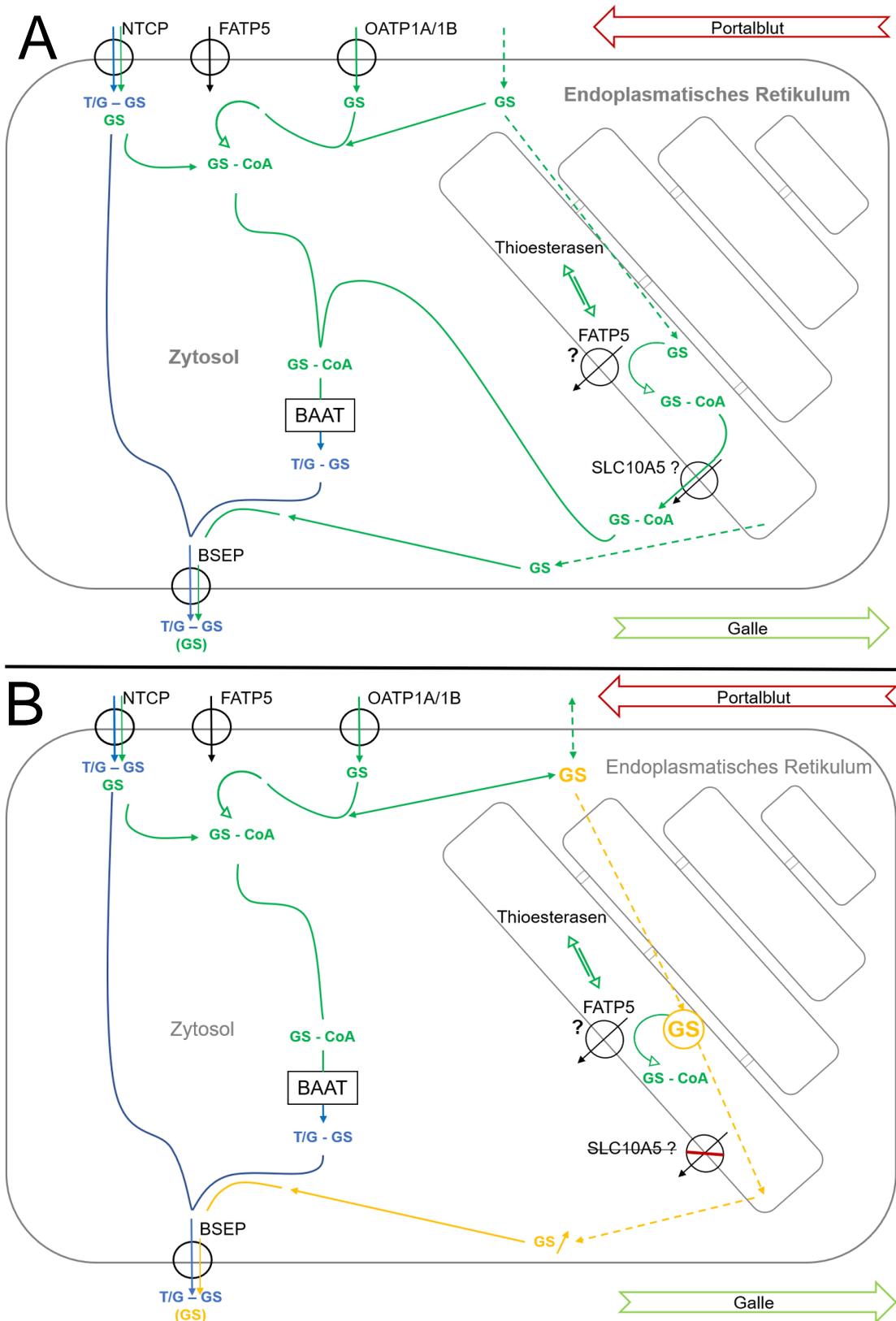


Abbildung 5-2: Potentieller Einfluss von SLC10A5 auf die Konjugation rezirkulierender Gallensäuren

In der basalen und apikalen Membran der Hepatozyten sind die wichtigsten hepatozellulären Transporter für konjugierte (T/S-G) und unkonjugierte (GS) Gallensäuren abgebildet. Mögliche Passage-Wege durch Hepatozyten konjugierter Gallensäuren sind entlang der blauen Linien dargestellt, die entsprechenden Passage-Wege unkonjugierter Gallensäuren in grün. Gestrichelte Linien zeigen

eine potentielle Diffusion über Membranen ohne Einfluss eines Transportsystems. In orange sind Wege der Gallensäuren gezeigt, die möglicherweise durch den Verlust von SLC10A5 in den Fokus rücken. Das „Fragezeichen“ bei FATP5 in der Membran des ERs verdeutlicht, dass die CoA-Kopplung im Gegensatz zur Kopplung an der Plasmamembran auf der N-terminalen Seite des Proteins stattfinden müsste. Diese Unsicherheit wird im Text weiter thematisiert.

A – Unter physiologischen Umständen gelangen Gallensäuren, die nicht an der Plasmamembran zu GS-CoA aktiviert werden, teilweise passiv in das ER, wo sie durch FATP5 aktiviert werden. Ein bislang unbekanntes Transportsystem, welches SLC10A5 sein könnte, bringt die CoA-gekoppelten Gallensäuren dann in das Zytosol, wo diese von BAAT konjugiert werden können um dann aktiv in die Gallenkanälchen gepumpt zu werden.

B – In der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus kann der Transport von CoA-gekoppelten Gallensäuren aus dem ER in das Zytosol nicht mehr stattfinden. Durch Thioesterasen, die der Gallensäureaktivierung von FATP5 entgegenwirken, können unkonjugierte Gallensäuren das ER passiv verlassen und gelangen entweder direkt in die Gallenkanälchen oder werden vermehrt durch das plasmamembranständige FATP5 aktiviert und im Zytosol konjugiert. Dadurch kommt es über einen längeren Zeitraum zu einer Akkumulation konjugierter und unkonjugierter sekundärer Gallensäuren in den verschiedenen Teilen des Enterohepatischen Kreislaufs.

Der Großteil aller Gallensäuren gelangt über Transporter aus dem Portalblut in die Leberzellen. NTCP transportiert hauptsächlich konjugierte Gallensäuren (Hofmann und Hagey, 2008) und die unspezifischere Aufnahme konjugierter und unkonjugierter Gallensäuren wird durch die OATP1A/1B Transporter vermittelt (Dawson et al., 2009). Unkonjugierte Gallensäuren gelangen auf Grund ihrer physikochemischen Eigenschaften auch passiv per Diffusion über die Plasmamembran. Ein Teil der unkonjugierten Gallensäuren wird direkt an der Plasmamembran von FATP5 an CoA gekoppelt. Untersuchungen zum Fettsäuretransport von FATP5 zeigen, dass weitere Oberflächenproteine, wie zum Beispiel CD36, als Co-Faktor für FATP5 dienen. CD36 „fängt“ Substrate dazu für FATP5 ein, um einen Transport zu ermöglichen (Doege und Stahl, 2006). Die Tatsache, dass CD36 oder andere Proteine als Co-Faktor für die CoA Kopplung durch FATP5 dienen, ist so durchaus denkbar. Bislang wurde für SLC10A5 keine Lokalisation in der Plasmamembran gezeigt (Pellicoro, 2008; Aretz, 2015) und auch in dieser Arbeit wurde immer ein streng intrazelluläres Expressionsmuster beobachtet. Dadurch ist es unwahrscheinlich, dass SLC10A5 an den plasmamembranständigen CoA-Kopplungen beteiligt ist oder dort einen Transport vermittelt.

Messungen von Gallensäurekonzentrationen im Lebergewebe von Ratten zeigen deutlich, dass nicht alle unkonjugierten Gallensäuren, darunter Deoxycholat und Hyodeoxycholat, an der Plasmamembran abgefangen werden können, um an CoA gekoppelt zu werden, sondern dass ein Teil der Gallensäuren frei im Zytosol vorliegt (Setchell et al., 1997). Unkonjugierte Gallensäuren können sich durch ihre lipophilen Eigenschaften relativ frei in der Zelle und über innere Zellgrenzen bewegen. Gallensäuren, die so in das Endoplasmatische Retikulum gelangen, werden dort in der Theorie durch FATP5 an CoA gekoppelt und sind dadurch allein durch ihre Größe schwer membrangängig. Zusätzlich verändert sich der LogP-Wert der Gallensäuren. Am Beispiel von Cholat zu Choloyl-CoA betrachtet, verschiebt sich der LogP-

Wert von 2,02 (lipophil) auf -4,3 (hydrophil). Die Reihenfolge der Lipophilie einzelner Gallensäuren ist dabei: DCA > CDCA > CA > HCA > UDCA > HDCA > UCA (Roda et al., 1990). Das zeigt vor allem, dass Deoxycholat sich frei in der Zelle bewegen kann und die CoA Kopplung in der Zelle benötigt wird, um das Molekül zu binden.

Die CoA-Kopplung durch FATP5 im ER ist jedoch auch gleichzeitig die größte Schwäche dieser Hypothese, denn die Orientierung bezogen auf die Transportrichtung von FATP5 in der Membran des ERs, wäre genau entgegengesetzt der Ausrichtung von FATP5 in der Plasmamembran der Zelle. Allerdings könnte die CoA-Kopplung durch FATP5 unabhängig von der Transportrichtung sein und auch in dieser Ausrichtung funktionieren. Eine weitere Erklärung wäre, dass bislang in diesem Zusammenhang unbekannte Enzyme die Kopplung von CoA an Gallensäuren im ER durchführen.

Für den Fettstoffwechsel ist beschrieben, dass die Kopplung von Fettsäuren an CoA immer in einem Gleichgewicht mit der Trennung beider Moleküle durch Thioesterasen steht. Dieser Mechanismus wird von Zellen zur Kontrolle des intrazellulären Lipidhaushalts genutzt (Hunt und Alexson, 2002). Fettsäuren, die nicht CoA gebunden sind, können nicht weiterverarbeitet werden und sind somit aus Sicht des Energiestoffwechsels „entkoppelt“. Eine Gruppe von Proteinen, die ausschließlich als Thioesterasen dienen, ist die Gruppe der Acyl-CoA-Thioesterasen (ACOTs) (Brocker et al., 2010; Tillander et al., 2017). In den Peroxisomen konkurriert BAAT mit der Thioesterase ACOT 8 (PTE-2) um die vorhandenen CoA-gekoppelten Gallensäuren. Bedingt durch die Lokalisation im Peroxisom handelt es sich bei diesen Gallensäuren höchstwahrscheinlich um CoA-gekoppelte Vorläufer von Gallensäuren, die auf dem Weg der Neusynthese entweder von BAAT an Taurin oder Glycin konjugiert oder durch ACOT 8 von CoA getrennt werden (Hunt und Alexson, 2002). Auch in mikrosomalen Fraktionen von Zellen wurden bereits Thioesterasen beschrieben. Sowohl im ER von aus Ratten gewonnenen Enterozyten (Lehner und Kuksis, 1993) als auch im ER von Rattenleberzellen (Kawashima et al., 1981) und Rattennierenzellen (Tsujiita und Okuda, 1993) wurde die Aktivität von Thioesterasen beschrieben. In der Leber ist das die Carboxylesterase 4 (ES-4) (Alexson et al., 1993; Robbi et al., 1996). Dieses Enzym ist im Lumen des ERs lokalisiert, wird nicht durch Nahrungseinflüsse oder peroxisomale Einflüsse reguliert und ist unter Thyroxin Behandlung oder nach einer Thyroidektomie herabreguliert (Hunt und Alexson, 2002). Deshalb wird für ES-4 keine Rolle im Abbau von Fettsäuren vermutet und eine genaue Funktion im ER konnte bislang lediglich gemutmaßt, jedoch nicht beschrieben werden (Hunt und Alexson, 2002). Zusätzlich zeigt ES-4 eine Steuerung durch den Kernrezeptor RXR (Jones et al., 2013), einem Kernrezeptor, der als Heterodimer aus FXR und RXR ein Steuerelement in der Gallensäurehomöostase darstellt (Li und Chiang, 2013). ES-4 könnte somit CoA-gebundene, rezirkulierende Gallensäuren im ER der Leber wieder entkoppeln und somit entgegen der Funktion von FATP5 arbeiten. Ein weiteres Protein, welches diese

150

Funktion übernehmen könnte, ist ACOT11 (Desai et al., 2017). Die Expression dieser Thioesterase ist hauptsächlich im braunen Fettgewebe, ein signifikanter Anteil wird jedoch auch im ER der Leber exprimiert. ACOT11 reagiert auf den Fettstoffwechsel und über Nahrung zugeführte Fette (Desai et al., 2017) und könnte so eine Brücke zum Gallensäurestoffwechsel schlagen. Weder für ES-4 noch für ACOT11 wurde bislang eine Thioesteraseaktivität für Gallensäuren untersucht.

Zusammengefasst stellt sich durch das Zusammenspiel von FATP5 und Thioesterasen im ER ein Gleichgewicht aus freien Gallensäuren und CoA-gekoppelten Gallensäuren ein. Der wahrscheinlichste Nutzen dieses Mechanismus ist der Schutz des ERs vor einer zu großen Menge an CoA-gekoppelten Gallensäuren. Die CoA-gekoppelten Gallensäuren könnten das ER, wie bereits beschrieben, nicht mehr durch Diffusion verlassen, sondern benötigen ein bisher unbekanntes Transportsystem. Diese Funktion könnte durch SLC10A5 in der Membran des ERs ausgeübt werden. Die durch SLC10A5 ausgeschleusten Gallensäuren könnten dann von der zytosolisch lokalisierten BAAT an Taurin oder Glycin konjugiert und über BSEP in die Galle ausgeschieden werden.

Wenn CoA-gekoppelte Gallensäuren das Endoplasmatische Retikulum durch den Verlust von SLC10A5 nicht mehr verlassen können, würde das bedeuten, dass ausschließlich Gallensäuren, die bereits an der Plasmamembran durch FATP5 aktiviert wurden, von BAAT konjugiert werden können. Gallensäuren, die das Endoplasmatische Retikulum erreichen, würden dieses nur noch in ihrer freien Form und nicht konjugiert verlassen und ihre Konzentration würde durch eine ineffiziente CoA-Kopplung intrazellulär ansteigen. Dieser leichte intrazelluläre Anstieg würde mit der Zeit durch eine gesteigerte Ausscheidung dieser Gallensäuren zu einem Anstieg der Anteile der unkonjugierten Gallensäuren im gesamten Gallensäurepool führen. Durch die Rekonjugation dieser Gallensäuren bei jeder Zirkulation würden dann mehr Taurodeoxycholat und Taurohyodeoxycholat in den Hepatozyten gebildet und damit, wie von den gemessenen Konzentrationen gestützt, auch in der Galle. Dies führt zur vermehrten bakteriellen Dekonjugation im Darm und zu den dort gemessenen erhöhten Mengen an Deoxycholat und Hyodeoxycholat, die dann zu einer vermehrten Ausscheidung und auch Resorption im Gegensatz zu den Wildtyp Tieren führen würden. Bei einer höheren Menge Deoxycholat im Portalblut steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass diese Gallensäure die Leber passiert und in die Peripherie gelangt, wie es die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen. Die Veränderungen durch ein Fehlen eines Transportes von aktivierten Gallensäuren aus dem ER in das Zytosol sind in Abbildung 5-2 dargestellt.

Die Theorie einer fehlerhaften Konjugation von rezirkulierenden Gallensäuren in der Leber birgt jedoch eine Reihe von offenen Fragen, die nicht geklärt werden können. Eine davon ist zum Beispiel, wie bereits erklärt, die Funktionsweise und Ausrichtung von FATP5 im ER.

Zusätzlich lassen sich die gemessene Erhöhung der Taurodeoxycholat und Taurohyodeoxycholat Konzentrationen in der Galle nur indirekt erklären. Bei einer fehlerhaften CoA-Kopplung rezirkulierender Gallensäuren und der daraus folgenden Steigerung der intrazellulären Konzentration dieser Gallensäuren wäre zu erwarten, dass diese potentiell zytotoxische Situation durch die vermehrte Abgabe dieser unkonjugierten Gallensäuren in die Galle gelöst werden würde. Dies könnte durch die effektive passive Reabsorption von Deoxycholat und Hyodeoxycholat im Darm zwar sekundär auch zu einer gesteigerten Menge der Taurinkonjugate dieser Gallensäuren führen, ein Anstieg der konjugierten Formen ohne einen Anstieg der unkonjugierten Formen, wie er in der *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Maus in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist jedoch unwahrscheinlich und lässt sich durch diese Theorie nicht vollständig erklären. Zusätzlich widerspricht die Regulation von SLC10A5 über FXR dem, was für andere Leberenzyme gilt. Im Grundsatz führt eine erhöhte Expression von FXR zu drei Reaktionen: Herunterregulierung der *de novo* Synthese von Gallensäuren, Herunterregulierung von NTCP und weniger Aufnahme von Gallensäuren aus dem Portalblut sowie Steigerung der Expression von BSEP in der apikalen Membran für einen gesteigerten Gallensäure-Efflux (Song et al., 2008). Kurz gesagt wird die Gallensäurezufuhr heruntergefahren und die Ausschleusung gesteigert. In der hier aufgezeigten Theorie wäre der Transport CoA-gekoppelter Gallensäuren aus dem ER als Ausschleusungsmechanismus angesehen und eine gesteigerte Expression würde zu einer gesteigerten „Entgiftung“ und einem Schutz der Zelle führen. *In vitro* zeigt SLC10A5 jedoch eine entgegengesetzte Regulation, also eine Senkung der Expression durch FXR (Pellicoro, 2008). Dies wäre die einzige Ausnahme dieser Art und würde der Funktion der Regulation über FXR widersprechen. Zusammengefasst lässt sich das durch die Cholatfütterung in der *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Maus festgestellte Konjugationsdefizit (Aretz, 2015) in dieser Arbeit nicht zufriedenstellend erklären. Möglicherweise ist eine Funktion von SLC10A5 in der Leber alleine zu isoliert in der Betrachtung und nur die Untersuchung des Zusammenspiels von SLC10A5 in der Leber, dem Darm und den Nieren können hierfür eine Lösung bieten.

5.4.5 Einfluss auf die Rehydroxylierung von Gallensäuren

Eine Besonderheit des Gallensäurestoffwechsels ist die Rehydroxylierung sekundärer Gallensäuren in der Leber. Dieser Mechanismus dient dazu, primäre Gallensäuren, die durch intestinale Bakterien zu sekundären Gallensäuren dehydroxyliert wurden, in der Leber durch eine Rehydroxylierung wieder zu primären Gallensäuren zu machen und somit zu entgiften (Hofmann und Hagey 2008). Im Fokus steht dabei die Hydroxylgruppe am siebten Kohlenstoffatom des Steroidgerüsts. Durch die bakterielle 7 α -Dehydroxylierung wird Cholat zu Deoxycholat und Chenodeoxycholat zu Litocholat umgebaut. Diese sekundären Gallensäuren können in einigen Spezies durch eine enzymatische 7 α -Hydroxylierung wieder in ihre primären

Formen umgebaut und damit entgiftet werden (Hofmann, 2004; Hofmann and Hagey, 2008). Der Mensch ist zwar nicht in der Lage, Deoxycholat oder Litocholat zu rehydroxylieren und muss auf andere Mechanismen der Entgiftung, wie zum Beispiel die Sulfatierung und Ausscheidung über den Darm, zurückgreifen (Yamashita et al., 1989; Hofmann and Hagey, 2008). Allerdings gibt es eine effektive Rehydroxylierung von Deoxycholat in Ratten (Bergström et al., 1954), Mäusen (Danielsson et al., 1959), Präriehunden (Cohen et al., 1983), Meerschweinchen (Cantafora et al., 1986) und dem Hamster (Yamashita et al., 1989). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die 7 α -Hydroxylierung mikrosomal lokalisiert ist, eine NADPH-Abhängigkeit zeigt und die Enzymaktivität durch Phenobarbital gesteigert werden kann, was zusammengenommen auf die Enzymklasse der Cytochrom P450 Oxidasen hinweisen könnte (Trülzsch et al., 1973). Da die Enzyme CYP7A1 und CYP8B1 bereits für Cholesterin eine 7 α -Hydroxylaseaktivität bei der *de novo* Synthese von Gallensäuren zeigen und beide Enzyme im ER lokalisiert sind (Davis et al., 2002; Henkel et al., 2017), ist es durchaus denkbar, dass auch die 7 α -Hydroxylierung rezirkulierender Gallensäuren von einem dieser Enzyme durchgeführt wird. Mitglieder des Cyp3-Genclusters bei Mäusen wurden für die Funktion der Rehydroxylierung bereits ausgeschlossen (Wahlström et al., 2017). Ein weiterer Punkt, der im Zusammenhang der Rehydroxylierung sekundärer Gallensäuren bereits geklärt wurde, ist die Präferenz der CYP-Oxidasen für bereits Taurin- oder Glycin-konjugierte Gallensäuren (Yamashita et al., 1989).

Für die Maus bedeutet das unter physiologischen Umständen, dass sekundäre Gallensäuren passiv oder aktiv in die Hepatozyten gelangen und dort in das ER diffundieren. Im ER werden sie durch FATP5 aktiviert (Steinberg et al., 2000) und anschließend durch die BAAT an Taurin konjugiert (Kase und Björkhem, 1989). Diese Taurin-konjugierten Gallensäuren können dann von CYP7A1, CYP8B1 oder in diesem Zusammenhang bislang unbekanntem Cytochrom P450 Oxidasen 7 α -hydroxyliert wieder in das Zytosol abgegeben werden. Dieser Vorgang ist in Abbildung 5-3 am Beispiel von Deoxycholat und Taurodeoxycholat dargestellt. Dasselbe Prinzip gilt jedoch auch für Hydoxycholat und Taurohydoxycholat.

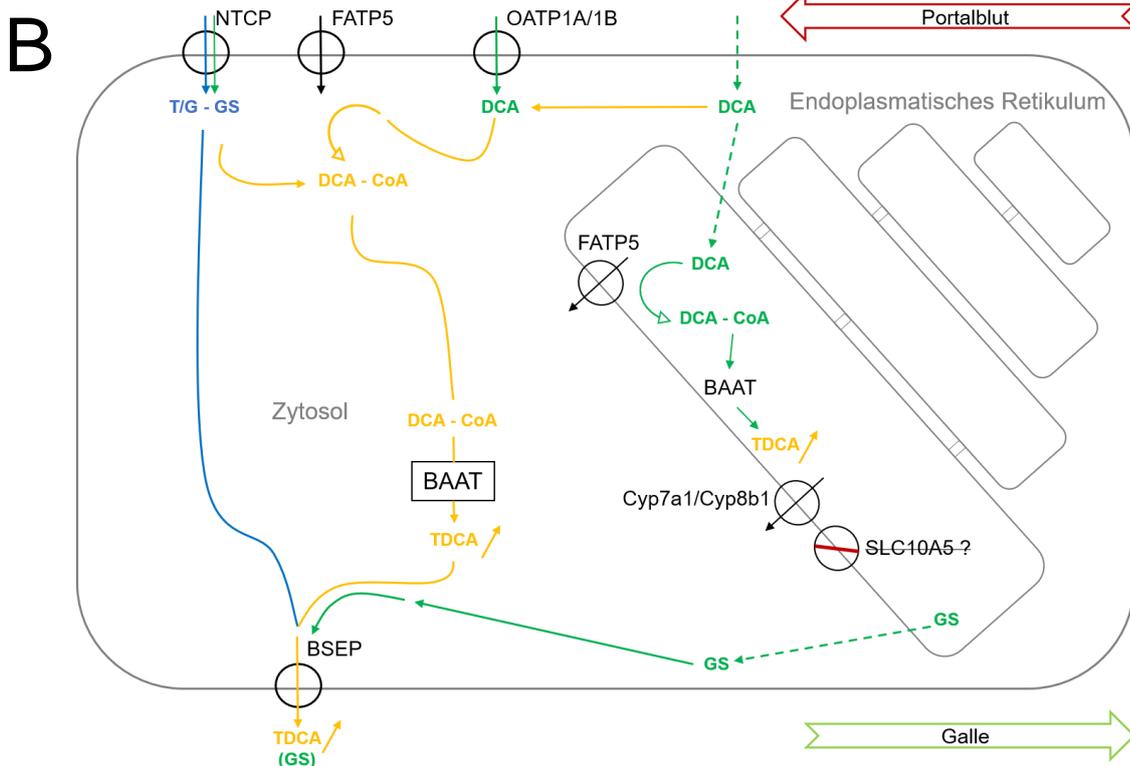
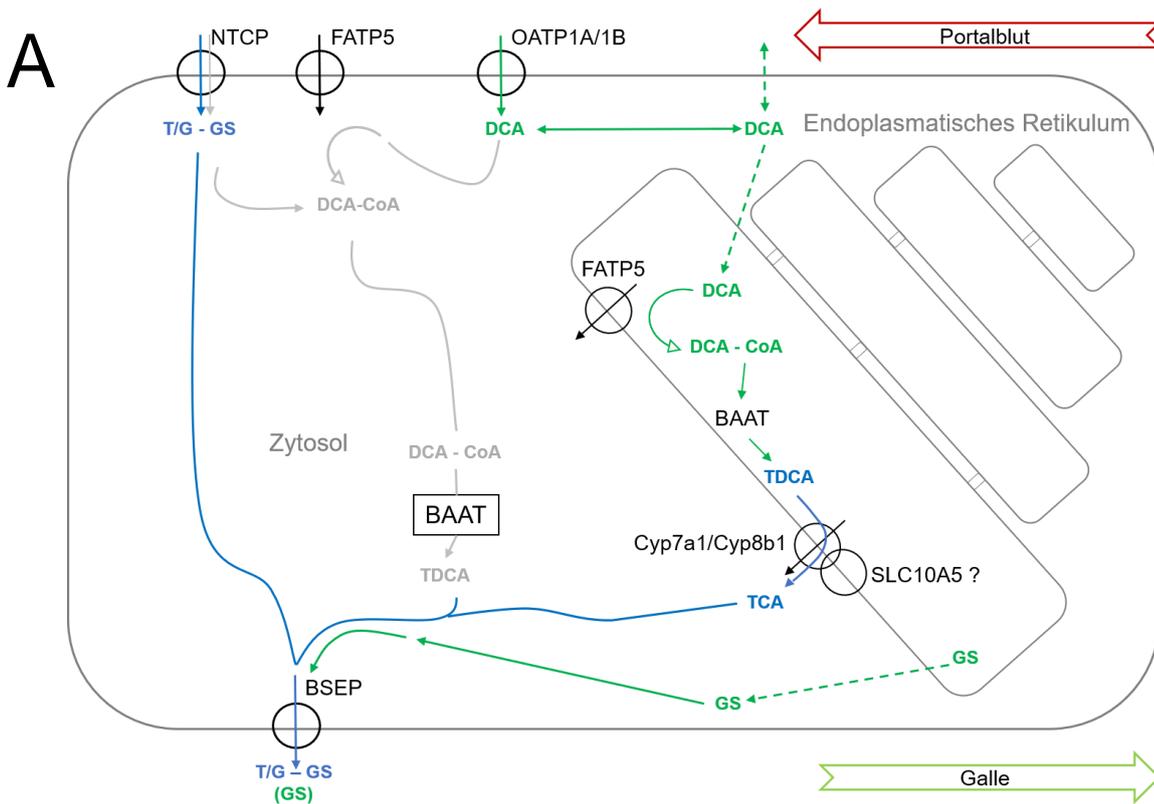


Abbildung 5-3: Potentieller Einfluss von SLC10A5 auf die Rehydroxylierung von sekundären Gallensäuren

In der basalen und apikalen Membran der Hepatozyten sind die wichtigsten hepatozellulären Transporter für konjugierte (T/S-G) und unkonjugierte (GS) Gallensäuren abgebildet. Mögliche Metabolismusswege für konjugierte Gallensäuren sind entlang der blauen Linien dargestellt, die entsprechenden Umsetzungen unkonjugierter Gallensäuren in grün. Gestrichelte Linien zeigen eine

potentielle Diffusion über Membranen ohne Einfluss eines Transportsystems. In orange sind Wege der Gallensäuren gezeigt, die möglicherweise durch den Verlust von SLC10A5 in den Fokus rücken.

A – Unter physiologischen Bedingungen gelangen sekundäre Gallensäuren aktiv über OATP1A/1B oder passiv in die Hepatozyten und diffundieren in das ER. Im ER werden diese sekundären Gallensäuren dann durch FATP5 aktiviert und durch BAAT konjugiert. Eine Cytochrom P450 Oxidase vermittelt dann in der Membran des ER, möglicherweise mit Hilfe von SLC10A5, die Rehydroxylierung der sekundären Gallensäuren zu ihren primären Formen. Diese können dann über BSEP in die Gallenkanälchen abgegeben werden.

B – In der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus können die im ER konjugierten sekundären Gallensäuren möglicherweise nicht mehr rehydroxyliert werden. Als alternative Entgiftungs-Route für sekundäre Gallensäuren bleibt nur die Aktivierung und Konjugation der sekundären Gallensäuren im Zytosol mit anschließendem Transport in die Gallenkanälchen. Die Folge ist ein Anstieg der Konzentrationen dieser konjugierten sekundären Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit und damit verbunden ein Anstieg der unkonjugierten Formen in Darm und Blut.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass CYP7A1 oder CYP8B1 die Rehydroxylierung alleine katalysieren können. Bereits für die Hydroxylierung von Cholesterin zu 7 α -Hydroxycholesterol wird diskutiert, ob CYP7A1 diesen Vorgang eigenständig katalysieren kann oder ein Interaktionspartner benötigt wird (Tempel et al., 2014). CYP7A1 besitzt eine Transmembrandomäne und ist ungefähr zur Hälfte in die Lipiddoppelschicht der ER-Membran eingebettet. Die Interaktionsdomäne des Proteins für Substrate befindet sich auf der der Lipidmembran zugewandten Seite und kann von dort Substrate aufnehmen. Für Cholesterin als normaler Bestandteil einer Lipidmembran ist es denkbar, dass ein einfacher Übertritt, zum Beispiel durch *flip-flop*, in die Interaktionsdomäne von CYP7A1 ohne die Hilfe eines weiteren Proteins stattfindet (Tempel et al., 2014). Für die Gallensäuren Taurodeoxycholat und Taurohyodeoxycholat ist der selbstständige Übertritt durch die Lipidmembran auf Grund ihrer Größe und der durch die Aminierung entstandenen Ladung undenkbar. An dieser Stelle ist es möglich, dass SLC10A5 die konjugierten sekundären Gallensäuren bindet, eine Interaktion mit CYP7A1 stattfindet und die Gallensäuren so in die Interaktionsdomäne des Enzyms gelangen. Eine weitere Möglichkeit, die zum gleichen Ergebnis führen würde wäre, dass SLC10A5 die konjugierten, sekundären Gallensäuren bindet, durch die Membran auf die zytosolische Seite bringt, mit CYP7A1 interagiert und das Substrat von außen in die Interaktionsdomäne bringt. Das Ergebnis der unterschiedlichen Interaktions- bzw. Funktionsvarianten ist jedoch immer das Gleiche: Als Produkt der Reaktion gelangt Taurocholat in das Zytosol und kann von BSEP in die Galle transportiert werden. Eine potentielle Art der Interaktion von CYP7A1 oder CYP8B1 mit SLC10A5 ist schematisch in Abbildung 5-4 gezeigt.

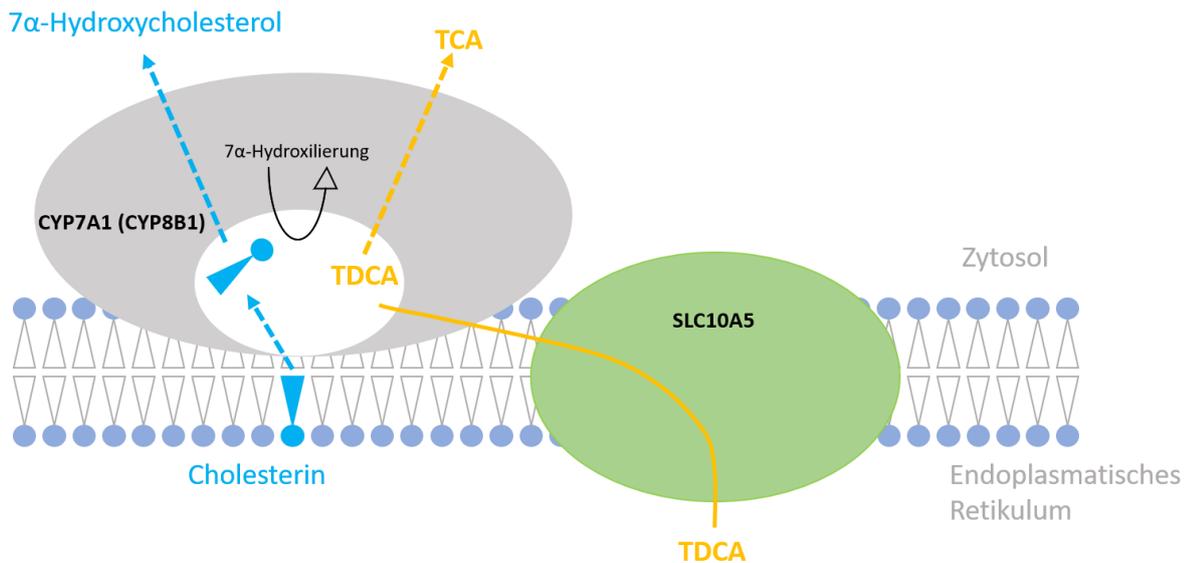


Abbildung 5-4: Hypothese zur Interaktion von SLC10A5 mit Cytochrom P450 Oxidasen in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums

Eine Funktion von Cyp7a1 ist die Hydroxylierung von Cholesterin zu 7 α -Hydroxycholesterol als Beginn der Synthese von Gallensäuren auf dem klassischen Weg. CYP8B1 vermittelt die Hydroxylierung einer Zwischenstufe der Gallensäuresynthese und entscheidet über das Verhältnis der primären Gallensäuren. Cholesterin kann als physiologischer Bestandteil von Membranen durch *flip-flop* in das aktive Zentrum der Oxidasen gelangen. Konjugierte sekundäre Gallensäuren können die Membran auf Grund ihrer Ladung und Hydrophilie nicht eigenständig passieren. Für eine Rehydroxylierung dieser Gallensäuren könnte SLC10A5 den Transport über die Membran bzw. in das aktive Zentrum der Oxidase vermitteln und somit die effektive Rehydroxylierung von Gallensäuren unterstützen. Grundlage für die Orientierung und Funktionsweise von CYP7A1 in dieser Abbildung ist die Veröffentlichung von Tempel et al. (2014).

Für die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus würde das bedeuten, dass CYP7A1, CYP8B1 oder bislang nicht identifizierte Enzyme Taurin-konjugierte sekundäre Gallensäuren nicht mehr rehydroxylieren können. Die theoretischen Folgen einer fehlenden Hydroxylierung von Deoxycholot in der Maus sind in Abbildung 5-3 dargestellt. Deoxycholot wird entweder aktiv in die Hepatozyten aufgenommen oder gelangt passiv über die Basalmembran. Durch die hohe Lipophilie kann Deoxycholot innerhalb der Zelle frei diffundieren und gelangt in das ER. Dort wird Deoxycholot durch das membranständige FATP5 aktiviert (Steinberg et al., 2000) und durch BAAT im Lumen des ER an Taurin konjugiert (Styles et al., 2016). Das entstandene Taurodeoxycholot kann durch die fehlende Expression von SLC10A5 nicht mehr durch Cytochrom P450 Oxidasen in der Membran des ER rehydroxyliert werden und es gelangt somit kein Taurocholot mehr in das Zytosol, welches dann durch BSEP in die Galle ausgeschüttet werden kann. Die Zelle besitzt als einzige Alternative die Konjugation von Deoxycholot an Taurin im Zytosol und die Ausscheidung von Taurodeoxycholot. Das gleiche Prinzip gilt für Hyodeoxycholot, welches nicht mehr zu Taurohyocholot rehydroxyliert wird, sondern als Taurohyodeoxycholot vermehrt in die Galle abgegeben werden muss. Auf diese Weise lassen

sich die Erhöhungen der Konzentrationen von Taurodeoxycholol und Taurohyodeoxycholol in der Gallenflüssigkeit, die in den *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurden, erklären. Auch die daraus folgenden Veränderungen in den anderen Bereichen werden durch diese Theorie abgedeckt. Die größeren Mengen Taurodeoxycholol und Taurohyodeoxycholol werden im Darm dekonjugiert und führen zu höheren Konzentrationen dieser Gallensäuren im Kot. Die resorbierte Menge dieser Gallensäuren ist ebenfalls größer, was im weiteren Verlauf des Enterohepatischen Kreislaufs zu einer größeren Menge Deoxycholol führt, die in der Leber nicht aus dem Portalblut gefiltert werden kann, sondern in die Peripherie gelangt. Dadurch, dass Hyodeoxycholol im Vergleich zu Deoxycholol weniger lipophil ist, ließe sich auch erklären, warum diese Gallensäure in der Peripherie nicht signifikant erhöht ist. Die geringere Lipophilie ermöglicht eine etwas effektivere Aufnahme in Hepatozyten und eine etwas geringere Wiederaufnahme in Enterozyten, sodass die Akkumulation von Hyodeoxycholol in der Peripherie weniger stark ausgeprägt wäre. Durch die Theorie einer fehlerhaften Rehydroxylierung in der *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Maus lassen sich alle in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede der Gallensäurekonzentrationen männlicher Mäuse erklären. Vor allem durch den Vergleich der Gallensäuren im Hinblick auf ihren Hydroxylierungsstatus (Abbildung 4-21) wird diese Theorie in den männlichen *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen unterstrichen. In der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot zeigte sich ein Anstieg der Kerngallensäure Deoxycholol. Eine Möglichkeit, solch eine Rehydroxylierung in Abhängigkeit von SLC10A5 zu untersuchen, wären primäre Hepatozyten aus *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen mit Zellen aus Wildtyp Tieren als Kontrolle. Unterschiede im Umsatz von NADP⁺/NADPH+H⁺ könnten dabei auf einen Unterschied in der Aktivität von Cytochrom P450 Oxidasen hinweisen und damit indirekt auf eine Beteiligung von SLC10A5.

Durch die Ergebnisse, die mit Hilfe der *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Maus generiert wurden, und der Hypothese einer Beteiligung von SLC10A5 an der Rehydroxylierung sekundärer Gallensäuren, bleibt jedoch die Frage zur Funktion des Proteins im Menschen, der unter physiologischen Bedingungen keine Rehydroxylierung in der Leber zeigt (Hansen und Williams 1971). Die Frage zur Funktion von SLC10A5 im Menschen und weiteren Spezies soll im Folgenden phylogenetisch betrachtet werden.

5.4.6 Phylogenetische Betrachtung von SLC10A5

Die Zusammensetzung der Galle verschiedener Spezies zeigt starke Variationen. Der komplexe Mechanismus, der die Zusammensetzung der Galle jeder einzelnen Spezies bestimmt, ist bislang nicht aufgeklärt. Einflussfaktoren sind zum Beispiel Spezies-spezifische Substrataffinitäten der Kernrezeptoren wie FXR und PXR, die Länge der Seitenkette der Gallensäuren oder, wie bereits beschrieben, die Fähigkeit zur Rehydroxylierung sekundärer Gallensäuren und damit deren Entgiftung (Hofmann et al. 2010). Auch die Expression von

SLC10A5 im Reich der Säugetiere ist variabel und deutet auf einen Einfluss von SLC10A5 auf die Zusammensetzung der Galle hin (Abbildung 5-5). Der Mensch und verwandte Primaten zeigen grundsätzlich ein intaktes *SLC10A5* Gen, sind, bezogen auf die im vorherigen Absatz hypothetisierte Funktion von SLC10A5, unter physiologischen Umständen jedoch nicht in der Lage, eine 7 α -Hydroxylierung der sekundären Gallensäuren Deoxycholat und Lithocholat durchzuführen. Ein Teil dieser Gallensäuren wird sulfatiert über die Nieren ausgeschieden, für Deoxycholat ist dieser Mechanismus jedoch minimal (Hanson und Williams, 1971). Untersuchungen an zirrhotischen Lebern zeigen jedoch, dass der Mensch einen Rehydroxylierungsmechanismus besitzen muss, der bei einer Schädigung der Leber zum Tragen kommt (Hanson und Williams, 1971). Eine Erhöhung der totalen Gallensäurekonzentration im Serum wird als Biomarker einer Leberschädigung diskutiert. Bei der Betrachtung individueller Gallensäuren fällt jedoch bei Deoxycholat ein Sinken der Konzentration bei Leberschädigung auf (Luo et al., 2018). Ohne einen Rehydroxylierungsmechanismus müssten die Deoxycholat-Konzentrationen durch die Steigung der Cholat-Konzentration ebenfalls ansteigen. SLC10A5 könnte beim Menschen somit eine Rolle bei der Rehydroxylierung von Deoxycholat bei Leberschädigungen spielen. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass SLC10A5 im Menschen bei einer Leberschädigung hochreguliert wird (Ahmad et al., 2012). Um diese Theorie für den Menschen zu beweisen, bedarf es allerdings weiterer Daten und Genanalysen aus geschädigtem Lebergewebe.

In einigen Spezies liegt der Anteil von Deoxycholat am gesamten Gallensäurepool bei über 50%. Zu diesen Spezies zählen das Hauskaninchen (88%) und auch Strauchkaninchen (55%), einige Primatenspezies wie der Südliche Schweinsaffe (69%), Pottwale (79%) und das Walross (53%) (Hofmann et al., 2010). Wie in Abbildung 5-5 gezeigt, codiert das *Slc10a5*-Gen bei Primaten für ein vollständiges Protein im gleichen Längenbereich wie beim Menschen und den Labornagetieren. Hier ist der Rückschluss naheliegend, dass SLC10A5 eine ähnliche Funktion wie beim Menschen einnimmt. Beim Kaninchen hingegen codiert der Genbereich von SLC10A5 für ein unvollständiges, nur 115 Aminosäuren langes Protein, welches dadurch sehr wahrscheinlich funktionslos ist. In den lagomorphen Spezies könnte ein Fehlen von SLC10A5 also dazu geführt haben, dass höhere Deoxycholatkonzentrationen im Gallensäurepool möglich sind.

Auffällig ist zudem, dass keine der überprüften landlebenden carnivoren Spezies ein *full-length* SLC10A5 Protein translatieren zu können scheint, was auf ein Pseudogen hindeutet. Grund dafür könnte zum einen sein, dass es andere Mechanismen gibt, wie Deoxycholat in diesen Spezies entgiftet wird. Zum anderen könnte eine höhere Toleranz gegenüber lipophileren Gallensäuren oder die ernährungsbedingte Notwendigkeit für einen lipophileren Gallensäurepool zur effektiven Nutzung einer carnivoren Lebensweise ursächlich sein. Hinweise dafür liefern Untersuchungen an Hunden, bei denen die Gallensäureprofile unter

einer Trockenfutterdiät mit denen einer Fütterung von gekochtem Fleisch verglichen wurden. Die Fütterung von Fleisch führte zu signifikant höheren Deoxycholat-Konzentrationen begleitet von höheren Ursodeoxycholat-Konzentrationen. Das zeigt zum einen, dass carnivore Spezies bedingt durch eine protein- und fettreiche Lebensweise natürlicherweise höhere Deoxycholat-Konzentrationen im Organismus tolerieren bzw. benötigen. Zum anderen sind für Ursodeoxycholat eine Reihe von zytoprotektiven Eigenschaften beschrieben und eine höhere Konzentration dieser Gallensäure könnte ein alternativer Schutzmechanismus gegen Deoxycholat oder andere lipophile Gallensäuren sein (Herstad et al., 2018).

Zusammengefasst liefert auch eine Betrachtung anderer Säugetierspezies im Hinblick auf die Gallensäurezusammensetzung und eine Expression von SLC10A5 Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins an der Rehydroxylierung.

		Länge des Leserahmens	
Carnivora	Grizzlybär	130 (Pseudogen)	
	Eisbär	130 (Pseudogen)	
	Hawaii-Mönchsrobbe	120 (Pseudogen)	
	Hund	103 (Pseudogen)	
	Walross	70 (Pseudogen)	← 53% DCA
	Katze	229 (Pseudogen)	
	Sibirischer Tiger	229 (Pseudogen)	
Rodentia	Maus	434	
	Ratte	434	
Lagomorpha	Kaninchen	115 (Pseudogen)	← 88% DCA
Artyodactyla / Perissodactyla	Pferd	437	
	Rind	438	
	Schaf	438	
	Schwein	438	
	Breitmaulnashorn	437	
Primates	Mensch	438	
	Schimpanse	439	
	Gorilla	438	
	Südlicher Schweinsaffe	443	← 69% DCA
	Rhesusaffe	443	
	Pavian	443	
Cetacea	Weißbüsichelaffe	444	
	Zwergwal	438	
	Pottwal	438	← 79% DCA
	Weißstreifendelfin	438	

Ernährung: carnivor
herbivor
omnivor

Abbildung 5-5: Vergleich der translatierten SLC10A5-Leserahmen verschiedener Spezies

Der humane *SLC10A5*-Leserahmen wurde mit dem Onlineprogramm BLAST den genomischen Sequenzen anderer Tierarten gegenübergestellt, deren Sequenz in der Datenbank vorhanden ist. Die Sequenzen der Tierarten wurden dann mit dem ORFinder auf den längsten Leserahmen überprüft und translatiert. Die Länge des translatierten Leserahmens ist in der Anzahl der Aminosäuren angegeben. Die Sortierung der Tierarten erfolgte nach ihrer jeweiligen Ordnung. Außerdem wurden die Tierarten nach ihrer vorwiegenden Ernährung (carnivor, herbivor oder omnivor) eingeteilt. Kurze Leserahmen wurden als Pseudogene gekennzeichnet. Bei diesen Tierarten ist davon auszugehen, dass kein *full-length* SLC10A5-Protein exprimiert wird.

5.5 Auswirkungen der erhöhten Konzentrationen sekundärer Gallensäuren

Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Phänotyp der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus besteht aus erhöhten Konzentrationen an Taurodeoxycholat und Taurohyodeoxycholat in der Galle und den unkonjugierten Formen dieser Gallensäuren im Kot und dem peripheren Blut (Deoxycholat) bzw. dem Kot (Hyodeoxycholat) in männlichen Tieren. Direkte Auswirkungen dieser vergleichsweise geringen Steigerung der Gallensäurekonzentrationen konnten nicht festgestellt werden. Es bleibt also die Frage nach der Relevanz von SLC10A5 für die Funktion des Organismus und der Gallensäurehomöostase unter physiologischen Bedingungen. Unter cholestatischen Bedingungen, wie sie durch die Fütterung von Cholsäure simuliert wurden, scheint eine zytoprotektive Funktion von SLC10A5 durch einen Einfluss auf die effektive Konjugation von Gallensäuren und damit deren Entgiftung offensichtlich (Aretz, 2015). Evolutionär betrachtet macht der Erhalt eines solchen Gens durchaus Sinn, da die Überlebenswahrscheinlichkeit bei natürlicherweise auftretenden Cholestasen, zum Beispiel bedingt durch extrahepatische bakterielle Infektionen, erhöht werden (Wagner et al., 2009). Im Folgenden sollen die negativen Einflüsse von Deoxycholat auf den Körper näher betrachtet werden, um eine mögliche Relevanz von SLC10A5 aufzuzeigen.

5.5.1 Der Hydrophobizitätsindex der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus

Einen ersten Hinweis darauf, dass die in dieser Arbeit gezeigten Veränderungen biologisch relevant sind, ist der Hydrophobizitätsindex nach Heuman (1989). Der Hydrophobizitätsindex ermöglicht, eine Analyse der Verschiebungen einzelner Gallensäuren wie Deoxycholat und Hyodeoxycholat in Bezug zum gesamten Gallensäurepool zu stellen. Die berechneten Hydrophobizitätsindizes der Gallenflüssigkeit der *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp-Mäuse (Männchen $-0,25 \pm 0,04$; Weibchen $-0,21 \pm 0,05$) bewegen sich in einem ähnlich hydrophilen Bereich wie der für Ratten ermittelte Wert von $-0,31 \pm 0,06$ (Heuman 1989) oder der für die C57/BL6-Maus ermittelte Wert von $-0,49 \pm 0,04$ (Thakare et al., 2018). Die leichten Unterschiede sind vermutlich bedingt durch die Berechnungsweise des Hydrophobizitätsindex. In der vorliegenden Arbeit wurden die unkonjugierten Gallensäuren in die Berechnung mit einbezogen, da diese nicht nur für die Galle erfolgte, die zu 99,9% aus konjugierten Gallensäuren besteht, sondern auch das periphere Blut und den Kot, wo das Verhältnis anders ist. Bei Thakare et al. (2018) wurde die Berechnung analog zur Berechnung von Heuman (1989) nur für die Galle durchgeführt, wodurch unkonjugierte Gallensäuren nicht betrachtet wurden.

Die statistisch signifikanten Unterschiede der Hydrophobizitätsindizes von männlichen *Slc10a5*^{+/+} Wildtyp- und *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen (Abbildung 4-22) geben einen direkten Hinweis darauf, dass die signifikanten Unterschiede einzelner Gallensäuren, wie sie in der

Slc10a5^{-/-} Knockout-Maus zu beobachten sind, den gesamten Gallensäurepool beeinflussen. Unabhängig von der Wirkung einzelner Gallensäuren auf die Regulation von Genen und die Gallensäurehomöostase, führt der durch den Knockout des *Slc10a5*-Gens entstandene hydrophobere Gallensäurepool zwangsläufig zu einer gesteigerten Toxizität im Gewebe. Unter Standardhaltungsbedingungen kann der Organismus der Maus diese Effekte noch kompensieren, die pathohistologischen Veränderungen im Darm der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäuse, wie sie von Aretz (2015) beschrieben wurden, zeigen jedoch auch, dass unter cholestatischen, extremeren Bedingungen diese Kompensation an ihre Grenze gerät. Im Umkehrschluss lässt sich also sagen, dass SLC10A5 in der Maus an der Aufrechterhaltung eines möglichst hydrophilen Gallensäurepools beteiligt ist.

5.5.2 Deoxycholat als Karzinogen

Bereits 1940 wurde für Deoxycholat erstmals eine karzinogene Wirkung beschrieben, seiner Zeit der erste experimentell induzierte Tumor mit einer Substanz, die vom Körper selbst in signifikanten Mengen gebildet wird (Cook et al., 1940). In den folgenden Jahrzehnten wurde für eine Vielzahl von Gallensäuren eine Förderung der Tumorbildung beschrieben, wenn diese mit bekannten karzinogenen Substanzen in Kombination appliziert wurden (Bernstein et al., 2005). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass speziell Deoxycholat im Menschen nicht nur in Kombination mit anderen Substanzen die Entstehung von Tumoren fördert, sondern selbst einen wichtigen Risikofaktor in der Entstehung von Tumoren des Verdauungstraktes darstellt. Bereits Konzentrationen von Deoxycholat, die sich im hohen physiologischen Bereich bewegen, reichen aus, um signifikant zur Tumorentstehung beizutragen (Bernstein et al., 2009). Dabei ist es wichtig, zwischen dem Menschen und Labornagetieren zu unterscheiden. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Entstehung von Tumoren und Deoxycholat wurde bislang hauptsächlich im Menschen beschrieben (Bayerdörffer et al., 1993). In Mäusen und Ratten konnte bislang in vielen Studien nur eine Wirkung als Tumorpromotor und nicht als Karzinogen gezeigt werden (Bernstein et al., 2005). Frühe Studien an Mäusen und Ratten wurden allerdings mit einer intra-rektalen Applikation verschiedenster Gallensäuren durchgeführt, zusätzlich wurden keimfreie Mäuse ohne funktionierendes Mikrobiom verwendet. Mit einer Zufuhr von Deoxycholat über die Nahrung wurde inzwischen auch für konventionelle Mäuse gezeigt, dass Deoxycholat nicht nur als Promotor für Tumoren, sondern auch als Karzinogen wirken kann (Bernstein et al., 2011). Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist vermutlich hauptsächlich die Expositionsdauer. Tumoren des Dickdarms, für die Deoxycholat als Faktor beschrieben ist, treten beim Menschen im Durchschnitt in einem Alter von 60 Jahren auf, die Forschung in Ratten und Mäusen ist durch die Lebenserwartung dieser Spezies hingegen beschränkt auf etwa 2,5 bis 3,5 Jahre (Wynder und Shigematsu, 1967; Bernstein et al., 2005). Bezogen auf die durchschnittliche Lebenserwartung erneuert sich das Epithel des Colons von Ratten und Mäusen schätzungsweise etwa 356 Mal, beim

Menschen liegt diese Zahl bei 5110 Erneuerungen (Bernstein et al., 2005). Dies bedeutet eine wesentlich höhere Chance für Entartungen von Darmzellen bezogen auf die Lebensdauer. Mäuse, in denen eine kanzerogene Wirkung von Deoxycholat nachgewiesen werden konnte, wurden zehn Monate mit einer Deoxycholat-angereicherten Diät gefüttert (Bernstein et al., 2011).

Die potentielle Kanzerogenität hoher Deoxycholat Konzentrationen wird verursacht durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese entstehen zum Beispiel durch die Wirkung von Gallensäuren auf membranständige Enzyme wie die Phospholipase A2, die bei ihrer Aktivierung Arachidonsäure freisetzt. Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen setzen dann beim Abbau von Arachidonsäure ROS frei, die wiederum zu einem DNA-Schaden führen können, welcher repariert werden muss. Fehler bei dieser Reparatur können dann zu Mutationen führen, die eine Entartung der Zelle verursachen (Bernstein et al., 2005).

Beim Menschen ist die Konzentration sekundärer Gallensäuren im Darm hauptsächlich von der aufgenommenen Nahrung abhängig. Eine vermehrte Aufnahme von Fetten steigert die Konzentration von Deoxycholat im Darm, wohingegen eine faserreiche Ernährung die Konzentration vermindert (Bianchini et al., 1989). Im Fokus der Untersuchungen steht beim Menschen die *western diet*, die angelehnt an die Ernährungsweise in Industrieländern gekennzeichnet ist durch eine hohe Zufuhr gesättigter Fettsäuren, Zucker, tierischem Protein und Alkohol gepaart mit wenig Ballaststoffen (Bernstein et al., 2011; Statovci et al., 2017). Die Folge sind höhere Inzidenzen chronischer Krankheiten des Verdauungstraktes wie Tumoren, Ulzerative Colitis und Morbus Crohn (Statovci et al., 2017). Die größte Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Mikrobiom, dass durch die Ernährung beeinflusst wird und so unter anderem zu höheren Deoxycholat Konzentrationen im Darm führen kann (Dermadi et al., 2017). Die Erhöhung der Deoxycholat-Konzentration im Kot, die im Menschen durch eine *western diet* induziert werden kann, bewegt sich dabei im Bereich eines Faktors von 2 (Reddy et al., 1980; Stadler et al., 1988). Die gleichen Erhöhungen faecaler Deoxycholat Konzentrationen sind auch für die Mäuse beschrieben, die bei einer 0,2% Deoxycholat-Fütterung eine erhöhte Tumorinzidenz nach 10 Monaten aufwiesen und damit eine kanzerogene Wirkung der Substanz bestätigten (Bernstein et al., 2011).

Auch in dieser Arbeit wurden in den männlichen *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen etwa um den Faktor 2 erhöhte Deoxycholat-Konzentrationen im Kot gemessen (Tabelle 4-5). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Maus Linie eine höhere Inzidenz für Tumore des Colons aufweisen müsste. Weder in der Arbeit von Aretz (2015) noch bei den *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäusen der vorliegenden Arbeit wurden offensichtliche Anzeichen für derartige Tumore gefunden. Allerdings wurde bei keiner dieser Untersuchungen der Fokus auf diesen Bereich gelegt. Außerdem waren die Tiere im Falle der Arbeit von Aretz (2015) 12 Wochen

alt, die Tiere in dieser Arbeit wurden mit einem Alter von 6 Monaten final untersucht. Basierend auf den Ergebnissen von Bernstein et al. (2011) ist es sehr wahrscheinlich, dass die Expositionsdauer zu kurz war. Um eine erhöhte Tumorzinzidenz bei der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus zu untersuchen, wäre ein Langzeitexperiment unter Standardhaltungsbedingungen sinnvoll, welches eine Dauer von zehn Monaten überschreiten müsste. So könnte eine mögliche protektive Wirkung von SLC10A5 für den Darm, im Hinblick auf die Entstehung von Tumoren, gezeigt werden.

Zusätzlich würden Untersuchungen an *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen, die eine *western diet* gefüttert bekommen, Aufschlüsse darüber geben, inwieweit ein Fehlen von SLC10A5 durch nahrungsbedingte Schwankungen in der Zufuhr von Fetten die Zusammensetzung der Galle beeinflussen würde.

5.5.3 Hormonelle Wirkung von Deoxycholol über TGR5

Die Entdeckung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors für Gallensäuren TGR5 (Maruyama et al., 2002) und der damit verbundenen Beschreibung einer neuen Klasse von Gallensäurerezeptoren (Foord et al., 2005), eröffnete eine völlig neue Blickweise auf die Funktionen von Gallensäuren. TGR5 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderem in endokrinen Drüsengewebe, Adipozyten, Muskulatur, Milz, Lymphknoten, ZNS und dem Nervensystem des Darms (Duboc et al., 2014). Neben Taurolithocholat und Lithocholat zählen Taurodeoxycholol und Deoxycholol zu den potentesten Liganden für TGR5 (Kawamata et al., 2003; Reich et al., 2017). Die Bindung von Gallensäuren an den in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptor führt zu einer vermehrten Bildung von cAMP und der Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden. Dadurch entsteht ein breites Spektrum an Reaktionen im gesamten Organismus, die auf die hormonartige Wirkung von Gallensäuren außerhalb des Enterohepatischen Kreislaufs zurückzuführen sind (Duboc et al., 2014; Zhou und Hylemon, 2014).

Zu den Wirkungen gehören immunsuppressive, anti-inflammatorische Effekte von Gallensäuren über TGR5 in Makrophagen. Durch die Aktivierung von TGR5 kommt es zu einer Inhibierung des pro-inflammatorischen *nuclear factor-kB* (Wang et al., 2011). Zusätzlich beeinflusst die Aktivierung von TGR5 die Differenzierung von dendritischen Zellen zu Zellen mit einem anti-inflammatorischen Phänotyp (Ichikawa et al., 2012). In der Leber wird TGR5 in Cholangiozyten und dem Epithel der Gallenblase exprimiert und vermittelt dort eine Sensorfunktion für den Füllungszustand der Gallenblase und eine Steuerung der biliären Chlorid-Sekretion (Keitel et al., 2009; Lavoie et al., 2010). Eine weitere wichtige Funktion von TGR5 ist die Gallensäurenabhängige Steuerung der Energiehomöostase (Duboc et al., 2014). Im braunen Fettgewebe und der Skelettmuskulatur führt die Aktivierung von TGR5 durch

Gallensäuren zu einer Freisetzung des Enzyms Iodothyronin-Deiodinase, welches die Umwandlung von inaktivem Thyroxin (T₄) zu aktivem Triiodothyronin (T₃) katalysiert, wodurch der grundlegende Energiehaushalt der Zelle verändert wird (Watanabe et al., 2006). Zusätzlich ist ein Einfluss von TGR5 auf den Glukosestoffwechsel durch eine Freisetzung des *glucagon-like peptides 1* im Darm (Thomas et al 2009) und eine cAMP bedingte Insulinfreisetzung in den Inselzellen des Pankreas beschrieben (Kumar et al. 2012). *Tgr5*^{-/-} Knockout-Mäuse zeigen einen gesunden, fertilen und äußerlich unauffälligen Phänotyp (Vassileva et al 2006). Unterschiede zeigten sich geschlechtsspezifisch in der Gewichtsentwicklung weiblicher *Tgr5*^{-/-} Knockout-Mäuse. Diese setzten unter einer hochkalorischen Diät im Gegensatz zu den Wildtyp Tieren oder männlichen *Tgr5*^{-/-} Knockout-Mäusen signifikant mehr Fett an, was auf einen verringerten Energiestoffwechsel hindeutet (Maruyama et al., 2006). Zusätzlich verringerte der Verlust des Gens die Insulin-Sensitivität der männlichen Tiere und steigerte sie in weiblichen Tieren (Vassileva et al., 2010).

Es zeigt sich also, dass die durch den Verlust von SLC10A5 in den männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen entstandenen Erhöhungen der Konzentrationen von Deoxycholat, Hyodeoxycholat und deren Taurin-Konjugaten nicht nur lokalen Einfluss auf die Gallensäurehomöostase durch ihre physikochemischen Eigenschaften oder die Interaktion mit Kernrezeptoren wie FXR haben, sondern im gesamten Organismus Auswirkungen über TGR5 haben können. Im Fokus stehen hier die erhöhten Deoxycholat-Konzentrationen im peripheren Blut des Körperkreislaufs, über die diese hormonartige Wirkung vermittelt werden kann. Die Untersuchungen des Energiestoffwechsels der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus ergaben in der vorliegenden Arbeit weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren signifikante Unterschiede. Das könnte unter anderem an den Haltungsbedingungen und der Ernährung der Tiere mit einem Standardfutter liegen. In den weiblichen *Tgr5*^{-/-} Knockout-Mäusen zeigten sich erst Unterschiede im Fettansatz unter einer hochkalorischen Diät (Maruyama et al., 2006). Hier wäre ein Versuch mit *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen, denen eine hochkalorische *western diet* gefüttert wird, angebracht, um mögliche Unterschiede im Energiestoffwechsel darzustellen. Denkbar wäre auch eine entgegengesetzte, kalorienrestriktive Fütterung, um einen Einfluss von SLC10A5 auf die Kompensation von Nahrungskarenzen zu untersuchen.

5.6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, Fluoreszenzfärbungen und der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus die Lokalisation und Funktion von SLC10A5 weiter eingegrenzt werden. Um eine Lokalisation des Proteins im ER zu bestätigen, sollte eine Kolokalisation von SLC10A5 und einem ER-spezifischen Protein im Gewebe von Mäusen angestrebt werden. Zusätzlich könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen von SLC10A5 Einblick in die Lokalisation des Proteins geben. Im Kontext der beschriebenen

Hypothese zu einer Funktion von SLC10A5 in der Rehydroxylierung von Gallensäuren könnten Kolokalisationen des Proteins mit verschiedenen ER-ständigen Cytochrom P450 Oxidasen sowohl eine teilweise Bestätigung der Theorie als auch eine Aussage über die Oxidase, die an der Rehydroxylierung beteiligt ist, liefern. Die funktionelle Beteiligung an der Rehydroxylierung könnte über den NADPH Verbrauch von primären Hepatozyten aus *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen und C57BL6N Wildtyp Tieren näher untersucht werden.

Für die *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus konnte in dieser Arbeit auch unter Standardfütterungsbedingungen eine Veränderung des Gallensäurestoffwechsels gezeigt werden. Zukünftige Untersuchungen an dieser Mauslinie sollten eine Sequenzierung des Mikrobioms priorisieren, um einen größeren Einfluss haltungsbedingter Faktoren auf den Gallensäurestoffwechsel auszuschließen. Im Hinblick auf geschlechtsspezifische Unterschiede, die in dieser Arbeit aufgezeigt wurden, sollte eine erneute Fütterung von Cholsäure, wie sie bereits Aretz (2015) beschrieben hat, durchgeführt werden. Diese Ergebnisse könnten Einblick in die Kompensationsfähigkeit des Knockouts weiblicher Mäuse liefern. Außerdem könnten durch weitere Spezialfütterungen, wie zum Beispiel eine *western diet* oder eine kalorienrestriktive Fütterung, der Einfluss von SLC10A5 auf den Energie- und Fettstoffwechsel untersucht werden.

Die wohl interessanteste Fragestellung, die sich aus der hier aufgezeigten Theorie zu einer Funktion von SLC10A5 bei der Rehydroxylierung sekundärer Gallensäuren ergibt, ist die Übertragbarkeit auf andere Tierarten und den Menschen. Für den Menschen könnten Proben von zirrhotischen Lebern auf eine erhöhte Expression von SLC10A5 untersucht werden. So könnte gezeigt werden, ob SLC10A5 bei einer Leberschädigung als zusätzlicher Schutzmechanismus vor reaktiven Gallensäurespezies genutzt wird. Das Gleiche gilt für alle Spezies, die ein intaktes *SLC10A5*-Gen besitzen, unter physiologischen Umständen jedoch keine nennenswerte Rehydroxylierung sekundärer Gallensäuren zeigen. Zusätzlich wäre eine Untersuchung von SLC10A5 in carnivoren Spezies interessant. Basierend auf den bekannten Sequenzen scheinen diese Tiere, wie in Abbildung 5-5 gezeigt, ein nicht mehr intaktes *Slc10a5*-Gen zu besitzen. Diese Tierarten müssen evolutionär gesehen also andere Mechanismen zum Schutz vor der Toxizität von speziellen Gallensäuren entwickelt haben. Ein eindeutiger Ausreißer bei dieser Einordnung ist das Kaninchen. Hier ließen sich physiologisch hohe Deoxycholatkonzentrationen teilweise auch durch ein nicht vorhandenes *Slc10a5*-Gen klären. Warum Kaninchen im Gegensatz zu den Labornagetierspezies diesen Mechanismus jedoch so entwickelt haben könnten, bleibt offen.

5.7 Zusammenfassung

Seit mehr als einem Jahrzehnt ist SLC10A5 nun Mitglied der Familie der natriumabhängigen Gallensäuretransporter. Diese Verwandtschaft ließ, basierend auf den Gründungsmitgliedern der SLC10 Familie NTCP und ASBT, schon früh die Hypothese aufkommen, dass SLC10A5 ebenfalls ein Protein der Gallensäurehomöostase ist. Die favorisierte Funktion war dabei die eines Gallensäuretransporters.

Die erste Bestätigung dieser Theorie lieferte die Regulation von SLC10A5 durch den Kernrezeptor FXR, der das Haupt-Steuerglied der Gallensäurehomöostase ist. Eine Funktion von SLC10A5 als Transportprotein für Gallensäuren konnte bislang nicht gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde eine potentielle Transportfunktion von SLC10A5 weiter untersucht. Dazu wurden zum einen Zellen genutzt, die eine stabil transfizierte Chimäre aus SLC10A5 und dem C-Terminus von NTCP in das Genom eingebaut hatten und dadurch eine Plasmamembranlokalisation von SLC10A5 ermöglichten. Zum anderen wurden Membranvesikel aus stabil transfizierten SLC10A5 Zellen generiert, in denen ein Transport gezeigt werden sollte. Aber auch in diesen Messungen konnte keine Transportaktivität von SLC10A5 für die untersuchten Gallensäuren gezeigt werden.

Der zweite Teil der De-Orphanisierung von SLC10A5 war die subzelluläre Lokalisation. Bereits in vorangegangenen Experimenten und Arbeiten zeigte sich ein streng intrazelluläres Expressionsmuster des Proteins, das der Expression bereits beschriebener Mitglieder der SLC10-Familie widersprach. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses intrazelluläre Expressionsmuster in Leber- und Nierenschnitten von Mäusen durch die Verwendung eines speziell gegen den C-Terminus von SLC10A5 generierten Antikörpers bestätigt. Die Spezifität dieses Antikörpers konnte in Schnitten von *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Mäusen verifiziert werden. Die subzelluläre Lokalisation von SLC10A5 sollte durch Kollokalisierung des Proteins mit organellenspezifischen Markern in der Lebendzellmikroskopie untersucht werden. Hier zeigten sich die größten Überschneidungen der Signale im endo-lysosomalen Apparat und dem ER. Eine Anreicherung des fluoreszenzmarkierten SLC10A5 im endo-lysosomalen Apparat war vermutlich auf die physikochemischen Eigenschaften des Fusionsproteins und die artifizielle Überexpression und Degradierung im Zellkulturmodell zurückzuführen. Im Kontext vorangegangener Arbeiten und dem intrazellulären Gallensäurestoffwechsel ist die Lokalisation im ER die favorisierte physiologische Lokalisation von SLC10A5 in dieser Arbeit.

Aufbauend auf dem Pilotversuch mit der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus von Aretz (2015), der einen massiven Einfluss von SLC10A5 auf die Entgiftung des mit Cholsäure überladenen Enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren zeigte, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Funktion von SLC10A5 unter physiologischen Bedingungen und ein Anteil am Energiestoffwechsel gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass in der

männlichen *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus unter Standardhaltungsbedingungen die Konzentrationen der konjugierten Gallensäuren Taurodeoxycholat und Taurohyodeoxycholat in der Galle und deren dekonjugierte Formen im Darminhalt signifikant erhöht waren. Zusätzlich waren höhere Deoxycholat-Konzentrationen im Blut des peripheren Kreislaufs messbar. In den weiblichen Mäusen traten keine signifikanten Unterschiede der Gallensäureprofile auf. Diese Ergebnisse deuten zumindest in den männlichen Tieren darauf hin, dass SLC10A5 gemeinsam mit Cytochrom P450 Oxidasen an der Rehydroxylierung sekundärer Gallensäuren im ER von Leberzellen beteiligt sein könnte. Eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels der *Slc10a5*^{-/-} Knockout-Maus konnte nicht gezeigt werden. Verschiebungen der Hydrophobizitätsindizes des Gallensäurepools in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot zeigen jedoch, dass der Verlust von SLC10A5 auch unter normalen Bedingungen einen Einfluss auf die physiologische Balance des Gallensäurestoffwechsels von Mäusen hat und eröffnet ein breites Spektrum an Untersuchungsmöglichkeiten für zukünftige Arbeiten mit SLC10A5

5.8 Summary

More than a decade ago SLC10A5 was introduced as a new member of the family of sodium dependent bile acid transporters. The sequence homology, which was based on the two first described SLC10 family members NTCP and ASBT, led to the hypothesis of SLC10A5 as a protein relevant for bile acid homeostasis. At this time the favored molecular function was a transport function for bile acids.

The first evidence for this theory was the connection between SLC10A5 and the nuclear bile acid receptor FXR, which is the main regulatory protein of the bile acid homeostasis. A transport function of SLC10A5 for bile acids has not been shown yet. In the present work a transport function was investigated with two different methods, a chimera of SLC10A5 and the c-terminal end of NTCP localized in the plasma membrane as well as membrane-vesicles made by ultracentrifugation of stably transfected SLC10A5 cells. Neither method showed a transport of the tested bile acids by SLC10A5.

The second part of deorphanizing SLC10A5 was finding the subcellular localization of the protein. Previous experiments and dissertations already indicated a strict intracellular expression pattern, contradicting the plasma membrane localization of described members of the SLC10 family. The intracellular expression pattern was confirmed by fluorescent staining of mice liver and kidney tissue with a custom-made antibody, directed against the c-terminus of SLC10A5. The specificity of this antibody was verified by the absence of a fluorescent signal in the tissue of *Slc10a5*^{-/-} knockout-mice. To investigate the subcellular localization of SLC10A5, the protein was colocalized with fluorescent cell-organelle markers via live-cell-

imaging. In these experiments the biggest overlaps of the signals were seen in the endo-lysosomal compartments and the ER, although the colocalization of SLC10A5 in the endo-lysosomal compartment was mainly based on the protein's physicochemical properties and the effects of *in vitro* protein-overexpression and degradation. Taken together, the results of preceding thesis and the intracellular bile acid metabolism lead in this dissertation to the conclusion that SLC10A5 is localized in the ER.

On the basis of the *Slc10a5*^{-/-} knockout-mouse pilot study by Aretz (2015), which showed a massive impact of SLC10A5 on the detoxification of the cholate-overloaded enterohepatic circulation, the function of SLC10A5 under normal feeding- and environmental conditions was investigated in the present work. The results indicated that taurodeoxycholic acid and taurohyodeoxycholic acid levels were elevated in the bile, and the unconjugated forms of these bile acids were elevated in the feces of male *Slc10a5*^{-/-} knockout-mice under standard conditions. Additionally, serum levels of deoxycholic acid were increased. Comparable observations in female *Slc10a5*^{-/-} knockout-mice could not be observed. In male *Slc10a5*^{-/-} knockout-mice this leads to the possibility of SLC10A5 as a co-factor in rehydroxylation of secondary bile acids in the liver ER. An impact of the gene-knockout on energy expenditure could not be observed. The differences in the calculated hydrophobicity indices of bile, serum and feces detected in the present work show a direct influence on the physiological balance of the bile acid metabolism of mice and lead to a variety of potential assays and methods to further investigate SLC10A5.

6 Literaturverzeichnis

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B., 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615–616.
- Agellon, L.B., Torchia, E.C., 2000. Intracellular transport of bile acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486, 198–209.
- Agnish, N., 1997. The Rationale for Culling of Rodent Litters. *Fundamental and Applied Toxicology* 38, 2–6.
- Ahmad, W., Ijaz, B., Hassan, S., 2012. Gene expression profiling of HCV genotype 3a initial liver fibrosis and cirrhosis patients using microarray. *Journal of Translational Medicine* 10, 1–17.
- Ajouz, H., Mukherji, D., Shamseddine, A., 2014. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World journal of surgical oncology* 12, 164.
- Alcalay, M., Toniolo, D., 1988. CpG islands of the X chromosome are gene associated. *Nucleic Acids Research* 16, 9527–9543.
- Alexson, S.E., Mentlein, R., Wernstedt, C., Hellman, U., 1993. Isolation and characterization of microsomal acyl-CoA thioesterase. A member of the rat liver microsomal carboxylesterase multi-gene family. *European journal of biochemistry* 214, 719–727.
- Alnouti, Y., Csanaky, I.L., Klaassen, C.D., 2008. Quantitative-Profiling of Bile Acids and their Conjugates in Mouse Liver, Bile, Plasma, and Urine Using LC-MS/MS. *Journal of chromatography* 873, 209–217.
- Anderson, C.M., Stahl, A., 2013. SLC27 fatty acid transport proteins. *Molecular aspects of medicine* 34, 516–528.
- Angelin, B., Björkhem, I., Einarsson, K., Ewerth, S., 1982. Hepatic Uptake of Bile Acids in Man: Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum. *The Journal of clinical investigation* 70, 724–731.
- Aretz, J.S., 2015. Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion des Orphan Carriers SLC10A5 in vitro und im *Slc10a5*-Knockout-Mausmodell. Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation. Universitätsbibliothek Gießen.

- Ashikov, A., Abu Bakar, N., Wen, X.-Y., Niemeijer, M., Rodrigues Pinto Osorio, G., Brand-Arzamendi, K., Hasadsri, L., Hansikova, H., Raymond, K., Vicogne, D., Ondruskova, N., Simon, M.E.H., Pfundt, R., Timal, S., Beumers, R., Biot, C., Smeets, R., Kersten, M., Huijben, K., Linders, P.T.A., van den Bogaart, G., van Hijum, S.A.F.T., Rodenburg, R., van den Heuvel, L.P., van Spronsen, F., Honzik, T., Foulquier, F., van Scherpenzeel, M., Lefeber, D.J., Mirjam, W., Han, B., Helen, M., Helen, M., van Peter, H., van de Jiddeke, K., Diego, M., Lars, M., Katja, B.H., Jozef, H., Majid, A., Kevin, C., Johann, T.W.N., 2018. Integrating glycomics and genomics uncovers SLC10A7 as essential factor for bone mineralization by regulating post-Golgi protein transport and glycosylation. *Human molecular genetics* 27, 3029–3045.
- Axelsson, M., Ellis, E., Mörk, B., Garmark, K., Abrahamsson, A., Björkhem, I., Ericzon, B.G., Einarsson, C., 2000. Bile acid synthesis in cultured human hepatocytes: support for an alternative biosynthetic pathway to cholic acid. *Hepatology* 31, 1305–1312.
- Bainton, D.F., 1981. The discovery of lysosomes. *Journal of Cell Biology* 91, 66-76.
- Bajor, A., Törnblom, H., Rudling, M., Ung, K.-A., Simrén, M., 2015. Increased colonic bile acid exposure: a relevant factor for symptoms and treatment in IBS. *Gut* 64, 84–92.
- Ballatori, N., Christian, W.V., Lee, J.Y., Dawson, P.A., Soroka, C.J., Boyer, J.L., Madejczyk, M.S., Li, N., 2005. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42, 1270–1279.
- Baxter, J.N., Grime, J.S., Critchley, M., Shields, R., 1985. Relationship between gastric emptying of solids and gall bladder emptying in normal subjects. *Gut* 26, 342–351.
- Bayerdörffer, E., Mannes, G.A., Richter, W.O., Ochsenkühn, T., Wiebecke, B., Köpcke, W., Paumgartner, G., 1993. Increased serum deoxycholic acid levels in men with colorectal adenomas. *Gastroenterology* 104, 145–151.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews* 29, 625–651.
- Beilke, L.D., Aleksunes, L.M., Holland, R.D., Besselsen, D.G., Begger, R.D., Klaassen, C.D., Cherrington, N.J., 2009. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 37, 1035–1045.
- Benoit, B., Meugnier, E., Castelli, M., Chanon, S., Vieille-Marchiset, A., Durand, C., Bendridi, N., Pesenti, S., Monternier, P.-A., Durieux, A.-C., Freyssenet, D., Rieusset, J., Lefai, E., Vidal, H., Ruzzin, J., 2017. Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice. *Nature medicine* 23, 990–996.

- Bergström, S., Gloor, U., Tjus, E., Burris, R.H., 1954. Metabolism of Bile Acids in Rat Liver Slices and Homogenates. Bile Acids and Steroids. *Acta Chemica Scandinavica*. 8, 1373–1377.
- Bernstein, C., Holubec, H., Bhattacharyya, A.K., Nguyen, H., Payne, C.M., Zaitlin, B., Bernstein, H., 2011. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Archives of toxicology* 85, 863–871.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C.M., Dvorak, K., 2009. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 3329–3340.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C.M., Dvorakova, K., Garewal, H., 2005. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutation research* 589, 47–65.
- Bianchini, F., Caderni, G., Dolara, P., Fantetti, L., Kriebel, D., 1989. Effect of dietary fat, starch and cellulose on fecal bile acids in mice. *The Journal of nutrition* 119, 1617–1624.
- Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., Sylvain A., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M.A., Gadella Jr., T.W.J., 2017. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nature Methods* 14, 53 – 56.
- Bijsmans, I.T.G.W., Bouwmeester, R.A.M., Geyer, J., Faber, K.N., van de Graaf, S.F.J., 2012. Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na⁺-dependent taurocholate co-transporting protein. *The Biochemical journal* 441, 1007–1015.
- Björkhem, I., Diczfalusy, U., Lütjohann, D., 1999. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Current opinion in lipidology* 10, 161–165.
- Björkhem, I., Einarsson, K., Melone, P., Hylemon, P., 1989. Mechanism of intestinal formation of deoxycholic acid from cholic acid in humans: evidence for a 3-oxo-delta 4-steroid intermediate. *Journal of lipid research* 30, 1033–1039.
- Brocker, C., Carpenter, C., Nebert, D.W., Vasiliou, V., 2010. Evolutionary divergence and functions of the human acyl-CoA thioesterase gene (ACOT) family. *Human Genomics* 4, 411.
- Brown, F.R., McAdams, A.J., Cummins, J.W., Konkol, R., Singh, I., Moser, A.B., Moser, H.W., 1982. Cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy: similarities in phenotype and accumulation of very long chain fatty acids. *The Johns Hopkins medical journal* 151, 344–351.
- Bunnett, N.W., 2014. Neuro-humoral signaling by bile acids and the TGR5 receptor in the gastrointestinal tract. *The Journal of physiology* 592, 2943–2950.

- Burger, S., Döring, B., Hardt, M., Beuerlein, K., Gerstberger, R., Geyer, J., 2011. Co-expression studies of the orphan carrier protein Slc10a4 and the vesicular carriers VACHT and VMAT2 in the rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 193, 109–121.
- Burke, B., Ellenberg, J., 2002. Remodelling the walls of the nucleus. *Molecular cell biology* 3, 487–497.
- Camilleri, M., Acosta, A., Busciglio, I., Boldingh, A., Dyer, R.B., Zinsmeister, A.R., Lueke, A., Gray, A., Donato, L.J., 2015. Effect of colesevelam on faecal bile acids and bowel functions in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 41, 438–448.
- Cantafora, A., Alvaro, D., Attili, A.F., Di Biase, A., Anza', M., Mantovani, A., Angelico, M., 1986. Hepatic 3α -dehydrogenation and 7α -hydroxylation of deoxycholic acid in the guinea-pig. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85, 805–810.
- Ceryak, S., Bouscarel, B., Fromm, H., 1993. Comparative binding of bile acids to serum lipoproteins and albumin. *Journal of lipid research* 34, 1661–1674.
- Chiang, J.Y.L., 2004. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of hepatology* 40, 539–551.
- Chiang, J.Y.L., 2009. Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of lipid research* 50, 1955–1966.
- Chiang, J.Y.L., 2017a. Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000 Research* 6, 2029.
- Chiang, J.Y.L., 2017b. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver research* 1, 3–9.
- Christie, D.M., Dawson, P.A., Thevananther, S., Shneider, B.L., 1996. Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *The American journal of physiology* 271, G377-85.
- Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M.G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A., Fiorucci, S., 2013. Correction: The Bile Acid Receptor GPBAR-1 (TGR5) Modulates Integrity of Intestinal Barrier and Immune Response to Experimental Colitis. *PloS one* 8.
- Cohen, B.I., Singhal, A.K., Mongelli, J., Rothschild, M.A., McSherry, C.K., Mosbach, E.H., 1983. Hydroxylation of secondary bile acids in the perfused prairie dog liver. *Lipids* 18, 909–912.

- Cook, J.W., Kennaway, E.L., Kennaway, N.M., 1940. Production of Tumours in Mice by Deoxycholic Acid. *Nature* 145, 627.
- Coppola, C., Gosche, J., Arrese, M., Ancowitz, B., Madsen, J., Vanderhoof, J., Shneider, B., 1998. Molecular analysis of the adaptive response of intestinal bile acid transport after ileal resection in the rat. *Gastroenterology* 115, 1172–1178.
- Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews. Neuroscience* 13, 701–712.
- Danielsson, H., Kazuno, T., Fex, H., Högberg, B., Kneip, P., Palmstierna, H., 1959. On the Metabolism of Bile Acids in the Mouse. *Bile Acids and Steroids. Acta Chemica Scandinavica* 13, 1141–1144.
- Davis, R.A., Miyake, J.H., Hui, T.Y., Spann, N.J., 2002. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing a SHP. *Journal of lipid research* 43, 533–543.
- Dawson, P.A., 2017. Roles of Ileal ASBT and OST α -OST β in Regulating Bile Acid Signaling. *Digestive diseases* 35, 261–266.
- Dawson, P.A., Haywood, J., Craddock, A.L., Wilson, M., Tietjen, M., Kluckman, K., Maeda, N., Parks, J.S., 2003. Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *The Journal of biological chemistry* 278, 33920–33927.
- Dawson, P.A., Hubbert, M., Haywood, J., Craddock, A.L., Zerangue, N., Christian, W.V., Ballatori, N., 2004. The Heteromeric Organic Solute Transporter α - β , Ost α -Ost β , Is an Ileal Basolateral Bile Acid Transporter. *The Journal of biological chemistry* 280, 6960–6968.
- Dawson, P.A., Lan, T., Rao, A., 2009. Bile acid transporters. *Journal of lipid research* 50, 2340–2357.
- Dempsey, J.L., Wang, D., Siginir, G., Fei, Q., Raftery, D., Gu, H., Yue Cui, J., 2019. Pharmacological Activation of PXR and CAR Downregulates Distinct Bile Acid-Metabolizing Intestinal Bacteria and Alters Bile Acid Homeostasis. *Toxicological sciences* 168, 40–60.
- Dermadi, D., Valo, S., Ollila, S., Soliymani, R., Sipari, N., Pussila, M., Sarantaus, L., Linden, J., Baumann, M., Nyström, M., 2017. Western Diet Deregulates Bile Acid Homeostasis, Cell Proliferation, and Tumorigenesis in Colon. *Cancer research* 77, 3352–3363.
- Desai, A., Alves-Bezerra, M., Li, Y., Ozdemir, C., Bare, C.J., Li, Y., Hagen, S.J., Cohen, D.E., 2017. Regulation of fatty acid trafficking in liver by thioesterase superfamily member 1S. *Journal of lipid research* 59, 368–379.

- Di Ciaula, A., Garruti, G., Lunardi Baccetto, R., Molina-Molina, E., Bonfrate, L., Wang, D.Q.-H., Portincasa, P., 2017. Bile Acid Physiology. *Annals of hepatology* 16 Suppl 1, 4-14.
- Doege, H., Baillie, R.A., Ortegon, A.M., Tsang, B., Wu, Q., Punreddy, S., Hirsch, D., Watson, N., Gimeno, R.E., Stahl, A., 2006. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* 130, 1245–1258.
- Doege, H., Stahl, A., 2006. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology* 21, 259–268.
- Dubail, J., Huber, C., Chantepie, S., Sonntag, S., Tüysüz, B., Mihci, E., Gordon, C.T., Steichen-Gersdorf, E., Amiel, J., Nur, B., Stolte-Dijkstra, I., van Eerde, A.M., van Gassen, K.L., Breugem, C.C., Stegmann, A., Lekszas, C., Marroofian, R., Karimiani, E.G., Bruneel, A., Seta, N., Munnich, A., Papy-Garcia, D., La Dure-Molla, M. de, Cormier-Daire, V., 2018. SLC10A7 mutations cause a skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta mediated by GAG biosynthesis defects. *Nature communications* 9, 3087.
- Duboc, H., Taché, Y., Hofmann, A.F., 2014. The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 46, 302–312.
- Eggink, H.M., Oosterman, J.E., Goede, P. de, Vries, E.M. de, Foppen, E., Koehorst, M., Groen, A.K., Boelen, A., Romijn, J.A., La Fleur, S.E., Soeters, M.R., Kalsbeek, A., 2017. Complex interaction between circadian rhythm and diet on bile acid homeostasis in male rats. *Chronobiology international* 34, 1339–1353.
- Eyssen, H.J., Pauw, G. de, van Eldere, J., 1999. Formation of Hyodeoxycholic Acid from Muricholic Acid and Hyocholic Acid by an Unidentified Gram-Positive Rod Termed HDCA-1 Isolated from Rat Intestinal Microflora. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3158–3163.
- Falany, C.N., Fortinberry, H., Leiter, E.H., Barnes, S., 1997. Cloning, expression, and chromosomal localization of mouse liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *Journal of lipid research* 38, 1139–1148.
- Falcon, A., Doege, H., Fluitt, A., Tsang, B., Watson, N., Kay, M.A., Stahl, A., 2010. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, 384-93.
- Ferdinandusse, S., Houten, S.M., 2006. Peroxisomes and bile acid biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 1427–1440.

- Fernandes, C.F., Godoy, J.R., Döring, B., Cavalcanti, M.C.O., Bergmann, M., Petzinger, E., Geyer, J., 2007. The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochemical and biophysical research communications* 361, 26–32.
- Foord, S.M., Bonner, T.I., Neubig, R.R., Rosser, E.M., Pin, J.-P., Davenport, A.P., Spedding, M., Harmar, A.J., 2005. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews* 57, 279–288.
- Gadaleta, R.M., Garcia-Irigoyen, O., Moschetta, A., 2017. Bile acids and colon cancer: Is FXR the solution of the conundrum? *Molecular aspects of medicine* 56, 66–74.
- Geer, E.B., Shen, W., 2009. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gender medicine* 6 Suppl 1, 60–75.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., Meier, P.J., 1998. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *The Journal of biological chemistry* 273, 10046–10050.
- Geyer, J., Döring, B., Meerkamp, K., Ugele, B., Bakhiya, N., Fernandes, C.F., Godoy, J.R., Glatt, H., Petzinger, E., 2007. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *The Journal of biological chemistry* 282, 19728–19741.
- Geyer, J., Fernandes, C.F., Döring, B., Burger, S., Godoy, J.R., Rafalzik, S., Hübschle, T., Gerstberger, R., Petzinger, E., 2008. Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152, 990–1005.
- Geyer, J., Godoy, J.R., Petzinger, E., 2004. Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 300–306.
- Geyer, J., Wilke, T., Petzinger, E., 2006. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 372, 413–431.
- Glick, B.S., Nakano, A., 2009. Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 113–132.
- Godoy, J.R., Fernandes, C., Döring, B., Beuerlein, K., Petzinger, E., Geyer, J., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *European journal of cell biology* 86, 445–460.

- Govindarajan, K., MacSharry, J., Casey, P.G., Shanahan, F., Joyce, S.A., Gahan, C.G.M., 2016. Unconjugated Bile Acids Influence Expression of Circadian Genes: A Potential Mechanism for Microbe-Host Crosstalk. *PloS one* 11, e0167319.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59–74.
- Grober, J., Zaghini, I., Fujii, H., Jones, S.A., Kliewer, S.A., Willson, T.M., Ono, T., Besnard, P., 1999. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *The Journal of biological chemistry* 274, 29749–29754.
- Grosser, G., Fietz, D., Günther, S., Bakhaus, K., Schweigmann, H., Ugele, B., Brehm, R., Petzinger, E., Bergmann, M., Geyer, J., 2013. Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter Soat (Slc10a6). *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 138, 90–99.
- Guo, C., Qi, H., Yu, Y., Zhang, Q., Su, J., Yu, D., Huang, W., Chen, W.-D., Wang, Y.-D., 2015. The G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor Gpbar1 (TGR5) Inhibits Gastric Inflammation Through Antagonizing NF- κ B Signaling Pathway. *Frontiers in pharmacology* 6, 287.
- H.T. Epstein, 1978. The Effect of Litter Size on Weight Gain in Mice. *The Journal of Nutrition* 108, 120-123.
- Hagenbuch, B., Dawson, P., 2004. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflügers Archiv* 447, 566–570.
- Hagenbuch, B., Lübbert, H., Stieger, B., Meier, P.J., 1990. Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of biological chemistry* 265, 5357–5360.
- Hagenbuch, B., Meier, P.J., 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1609, 1–18.
- Hagenbuch, B., Meier, P.J., 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 447, 653–665.

- Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lübbert, H., Meier, P.J., 1991. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10629–10633.
- Hanson, R.F., Williams, G., 1971. Metabolism of deoxycholic acid in bile fistula patients. *Journal of lipid research* 12, 688–691.
- Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., Gonzalez, F.J., 2001. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Molecular and cellular biology* 21, 1393–1403.
- He, D., Barnes, S., Falany, C.N., 2003. Rat liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase: expression, characterization, and peroxisomal localization. *Journal of lipid research* 44, 2242–2249.
- Henkel, A.S., LeCuyer, B., Olivares, S., Green, R.M., 2017. Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Hepatic Bile Acid Metabolism in Mice. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 3, 261–271.
- Herstad, K.M.V., Rønning, H.T., Bakke, A.M., Moe, L., Skancke, E., 2018. Changes in the faecal bile acid profile in dogs fed dry food vs high content of beef: a pilot study. *Acta veterinaria Scandinavica* 60, 29.
- Heuman, D.M., 1989. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *Journal of lipid research* 30, 719–730.
- Hoeke, M.O., Heegsma, J., Hoekstra, M., Moshage, H., Faber, K.N., 2014. Human FXR regulates SHP expression through direct binding to an LRH-1 binding site, independent of an IR-1 and LRH-1. *PLoS one* 9, e88011.
- Hofmann, A.F., 1989. Current concepts of biliary secretion. *Digestive diseases and sciences* 34, 16-20.
- Hofmann, A.F., 1999. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of internal medicine* 159, 2647–2658.
- Hofmann, A.F., 2004. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews* 36, 703–722.
- Hofmann, A.F., 2009. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Frontiers in bioscience* 14, 2584–2598.
- Hofmann, A.F., Hagey, L.R., 2008. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 2461–2483.

- Hofmann, A.F., Hagey, L.R., Krasowski, M.D., 2010. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significances. *Journal of lipid research* 51, 226–246.
- Hofmann, A.F., Roda, A., 1984. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of lipid research* 25, 1477–1489.
- Howard, P.J., Murphy, G.M., Dowling, R.H., 1991. Gall bladder emptying patterns in response to a normal meal in healthy subjects and patients with gall stones: ultrasound study. *Gut* 32, 1406–1411.
- Hu, Y.-B., Dammer, E.B., Ren, R.-J., Wang, G., 2015. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational neurodegeneration* 4, 18.
- Huang, S., Wang, Y., 2017. Golgi structure formation, function, and post-translational modifications in mammalian cells. *F1000Research* 6, 2050.
- Hubbard, B., Doege, H., Punreddy, S., Wu, H., Huang, X., Kaushik, V.K., Mozell, R.L., Byrnes, J.J., Stricker-Krongrad, A., Chou, C.J., Tartaglia, L.A., Lodish, H.F., Stahl, A., Gimeno, R.E., 2006. Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology* 130, 1259–1269.
- Human microbiome project, 2012. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- Hunt, M.C., Alexson, S.E.H., 2002. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* 41, 99–130.
- Hylemon, P.B., Melone, P.D., Franklund, C.V., Lund, E., Björkhem, I., 1991. Mechanism of intestinal 7 alpha-dehydroxylation of cholic acid: evidence that allo-deoxycholic acid is an inducible side-product. *Journal of lipid research* 32, 89–96.
- Ichikawa, R., Takayama, T., Yoneno, K., Kamada, N., Kitazume, M.T., Higuchi, H., Matsuoka, K., Watanabe, M., Itoh, H., Kanai, T., Hisamatsu, T., Hibi, T., 2012. Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology* 136, 153–162.
- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.-K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R.T., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2006. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3920–3925.

- Islam, K.B.M.S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Yokota, A., 2011. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 141, 1773–1781.
- Islinger, M., Voelkl, A., Fahimi, H.D., Schrader, M., 2018. The peroxisome: an update on mysteries 2.0. *Histochemistry and cell biology* 150, 443–471.
- Jahnel, J., Fickert, P., Hauer, A.C., Högenauer, C., Avian, A., Trauner, M., 2014. Inflammatory bowel disease alters intestinal bile acid transporter expression. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 42, 1423–1431.
- Jiang, L., Alber, J., Wang, J., Du, W., Yang, X., Li, X., Sanglard, D., Geyer, J., 2012. The *Candida albicans* plasma membrane protein Rch1p, a member of the vertebrate SLC10 carrier family, is a novel regulator of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *The Biochemical journal* 444, 497–502.
- Jin, L., Batra, S., Jeyaseelan, S., 2017. Deletion of Nlrp3 Augments Survival during Polymicrobial Sepsis by Decreasing Autophagy and Enhancing Phagocytosis. *Journal of immunology* 198, 1253–1262.
- Jones, R.D., Taylor, A.M., Tong, E.Y., Repa, J.J., 2013. Carboxylesterases are uniquely expressed among tissues and regulated by nuclear hormone receptors in the mouse. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 41, 40–49.
- Just, S., Mondot, S., Ecker, J., Wegner, K., Rath, E., Gau, L., Streidl, T., Hery-Arnaud, G., Schmidt, S., Lesker, T.R., Bieth, V., Dunkel, A., Strowig, T., Hofmann, T., Haller, D., Liebisch, G., Gérard, P., Rohn, S., Lepage, P., Clavel, T., 2018. The gut microbiota drives the impact of bile acids and fat source in diet on mouse metabolism. *Microbiome* 6, 134.
- Kang, D.-W., Park, J.G., Ilhan, Z.E., Wallstrom, G., Labaer, J., Adams, J.B., Krajmalnik-Brown, R., 2013. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PloS one* 8, e68322.
- Kase, B.F., Björkhem, I., 1989. Peroxisomal bile acid-CoA:amino-acid N-acyltransferase in rat liver. *The Journal of biological chemistry* 264, 9220–9223.
- Kashyap, P.C., Marcobal, A., Ursell, L.K., Larauche, M., Duboc, H., Earle, K.A., Sonnenburg, E.D., Ferreyra, J.A., Higginbottom, S.K., Million, M., Tache, Y., Pasricha, P.J., Knight, R., Farrugia, G., Sonnenburg, J.L., 2013. Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology* 144, 967–977.

- Kassam, A., Miao, B., Young, P.R., Mukherjee, R., 2003. Retinoid X receptor (RXR) agonist-induced antagonism of farnesoid X receptor (FXR) activity due to absence of coactivator recruitment and decreased DNA binding. *The Journal of biological chemistry* 278, 10028–10032.
- Katayama, H., Yamamoto, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., Miyawaki, A., 2008. GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell structure and function* 33, 1–12.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M., 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *The Journal of biological chemistry* 278, 9435–9440.
- Kawashima, Y., Katoh, H., Kozuka, H., 1981. Effect of clofibril acid administration on palmitoyl-CoA hydrolase activity in rat liver. *Journal of pharmacobio-dynamics* 4, 711–717.
- Keitel, V., Cupisti, K., Ullmer, C., Knoefel, W.T., Kubitz, R., Häussinger, D., 2009. The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology* 50, 861–870.
- Klumperman, J., Raposo, G., 2014. The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a016857.
- Kobayashi, M., Ikegami, H., Fujisawa, T., Nojima, K., Kawabata, Y., Noso, S., Babaya, N., Itoi-Babaya, M., Yamaji, K., Hiromine, Y., Shibata, M., Ogihara, T., 2007. Prevention and treatment of obesity, insulin resistance, and diabetes by bile acid-binding resin. *Diabetes* 56, 239–247.
- Kosters, A., Dawson, P.A., 2015. The Na(+) -taurocholate cotransporting polypeptide knockout mouse: A new tool for study of bile acids and hepatitis B virus biology. *Hepatology* 62, 19–21.
- Kwakye, J.B., Johnson, M.R., Barnes, S., Grizzle, W.E., Diasio, R.B., 1991. Identification of bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase in rat kidney. *Biochemical Journal* 280, 821–824.
- Lammerding, J., 2011. Mechanics of the nucleus. *Comprehensive Physiology* 1, 783–807.
- Larhammar, M., Patra, K., Blunder, M., Emilsson, L., Peuckert, C., Arvidsson, E., Rönnlund, D., Preobraschenski, J., Birgner, C., Limbach, C., Widengren, J., Blom, H., Jahn, R., Wallén-Mackenzie, Å., Kullander, K., 2015. SLC10A4 is a vesicular amine-associated transporter modulating dopamine homeostasis. *Biological psychiatry* 77, 526–536.

- Lavoie, B., Balemba, O.B., Godfrey, C., Watson, C.A., Vassileva, G., Corvera, C.U., Nelson, M.T., Mawe, G.M., 2010. Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of KATP channels. *The Journal of physiology* 588, 3295–3305.
- Lee, J., Azzaroli, F., Wang, L., Soroka, C.J., Gigliozzi, A., Setchell, K.D., Kramer, W., Boyer, J.L., 2001. Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 121, 1473–1484.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B., 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological reviews* 89, 147–191.
- Lehner, R., Kuksis, A., 1993. Purification of an acyl-CoA hydrolase from rat intestinal microsomes. A candidate acyl-enzyme intermediate in glycerolipid acylation. *The Journal of biological chemistry* 268, 24726–24733.
- Li, T., Chiang, J.Y.L., 2013. Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug metabolism reviews* 45, 145–155.
- Li, Y., Jadhav, K., Zhang, Y., 2013. Bile acid receptors in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochemical pharmacology* 86, 1517–1524.
- Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E., Gershon, M.D., 2006. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 2798–2807.
- Lisenbee, C.S., Karnik, S.K., Trelease, R.N., 2003. Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic* 4, 491–501.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265–275.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A.M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J.A., López-Guerrero, J.A., Aguilar-Quesada, R., 2016. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and biobanking* 14, 264–270.
- Luo, L., Aubrecht, J., Li, D., Warner, R.L., Johnson, K.J., Kenny, J., Colangelo, J.L., 2018. Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PloS one* 13.
- Lusis, A.J., Yu, J., Wang, S.S., 2007. The problem of passenger genes in transgenic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2100–2103.

- Ma, K., Saha, P.K., Chan, L., Moore, D.D., 2006. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation* 116, 1102–1109.
- Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H., Tanaka, K., 2002. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochemical and biophysical research communications* 298, 714–719.
- Maruyama, T., Tanaka, K., Suzuki, J., Miyoshi, H., Harada, N., Nakamura, T., Miyamoto, Y., Kanatani, A., Tamai, Y., 2006. Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *The Journal of endocrinology* 191, 197–205.
- Matsubara, T., Li, F., Gonzalez, F.J., 2013. FXR signaling in the enterohepatic system. *Molecular and cellular endocrinology* 368, 17–29.
- Matteis, M.A. de, Luini, A., 2008. Exiting the Golgi complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 273–284.
- Mekhjian, H.S., Phillips, S.F., Hofmann, A.F., 1979. Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Digestive diseases and sciences* 24, 545–550.
- Melton, E.M., Cerny, R.L., Watkins, P.A., DiRusso, C.C., Black, P.N., 2011. Human fatty acid transport protein 2a/very long chain acyl-CoA synthetase 1 (FATP2a/Acsvl1) has a preference in mediating the channeling of exogenous n-3 fatty acids into phosphatidylinositol. *The Journal of biological chemistry* 286, 30670–30679.
- Mendoza, M.E., Monte, M.J., El Mir, M.Y., Badia, M.D., Marin, J.J.G., 2002. Changes in the pattern of bile acids in the nuclei of rat liver cells during hepatocarcinogenesis. *Clinical Science* 102, 143–150.
- Mihalik, S.J., Steinberg, S.J., Pei, Z., Park, J., Kim, D.G., Heinzer, A.K., Dacremont, G., Wanders, R.J.A., Cuebas, D.A., Smith, K.D., Watkins, P.A., 2002. Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *The Journal of biological chemistry* 277, 24771–24779.
- Modica, S., Moschetta, A., 2006. Nuclear bile acid receptor FXR as pharmacological target: are we there yet? *FEBS letters* 580, 5492–5499.
- Monte, M.J., Marin, J.J.G., Antelo, A., Vazquez-Tato, J., 2009. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology* 15, 804–816.
- Monte, M.J., Martinez-Diez, M.C., El-Mir, M.Y., Mendoza, M.E., Bravo, P., Bachs, O., Marin, J.J.G., 2002. Changes in the pool of bile acids in hepatocyte nuclei during rat liver regeneration. *Journal of hepatology* 36, 534–542.

- Monte, M.J., Rosales, R., Macias, R.I.R., Iannota, V., Martinez-Fernandez, A., Romero, M.R., Hofmann, A.F., Marin, J.J.G., 2008. Cytosol-nucleus traffic and colocalization with FXR of conjugated bile acids in rat hepatocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 295, 54-62.
- Moore, W.E., Moore, L.H., 1995. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3202–3207.
- Motley, A.M., Hettema, E.H., 2007. Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *Journal of Cell Biology* 178, 399–410.
- Müller, M., Canfora, E.E., Blaak, E.E., 2018. Gastrointestinal Transit Time, Glucose Homeostasis and Metabolic Health: Modulation by Dietary Fibers. *Nutrients* 10.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* 42, 3858–3863.
- Naslavsky, N., Caplan, S., 2018. The enigmatic endosome - sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *Journal of cell science* 131.
- Niemi, M., 2007. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 8, 787–802.
- O'Byrne, J., Hunt, M.C., Rai, D.K., Saeki, M., Alexson, S.E.H., 2003. The human bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase functions in the conjugation of fatty acids to glycine. *The Journal of biological chemistry* 278, 34237–34244.
- Palmeira, C.M., Rolo, A.P., 2004. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 203, 1–15.
- Pandak, W.M., Kakiyama, G., 2019. The acidic pathway of bile acid synthesis: Not just an alternative pathway. *Liver research* 3, 88–98.
- Pandak, W.M., Ren, S., Marques, D., Hall, E., Redford, K., Mallonee, D., Bohdan, P., Heuman, D., Gil, G., Hylemon, P., 2002. Transport of cholesterol into mitochondria is rate-limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 277, 48158–48164.
- Parker, K.D., Albeke, S.E., Gigley, J.P., Goldstein, A.M., Ward, N.L., 2018. Microbiome Composition in Both Wild-Type and Disease Model Mice Is Heavily Influenced by Mouse Facility. *Frontiers in microbiology* 9, 1598.
- Pederson, T., 2011. The nucleus introduced. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3.
- Pellicoro, A., 2008. Hepatic peroxisome function in health and disease. s.n., 128 p.

- Perez, M.-J., Briz, O., 2009. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World journal of gastroenterology* 15, 1677–1689.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, J., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- Ramírez-Pérez, O., Cruz-Ramón, V., Chinchilla-López, P., Méndez-Sánchez, N., 2017. The Role of the Gut Microbiota in Bile Acid Metabolism. *Annals of hepatology* 16, 21-26.
- Reddy, B.S., Hanson, D., Mangat, S., Mathews, L., Sbaschnig, M., Sharma, C., Simi, B., 1980. Effect of high-fat, high-beef diet and of mode of cooking of beef in the diet on fecal bacterial enzymes and fecal bile acids and neutral sterols. *The Journal of nutrition* 110, 1880–1887.
- Reich, M., Klindt, C., Deutschmann, K., Spomer, L., Häussinger, D., Keitel, V., 2017. Role of the G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 in Liver Damage. *Digestive diseases* 35, 235–240.
- Rhodin, J., 1954. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Thesis, Stockholm, 76 pp.
- Ridlon, J.M., Kang, D.J., Hylemon, P.B., Bajaj, J.S., 2014. Bile acids and the gut microbiome. *Current opinion in gastroenterology* 30, 332–338.
- Robbi, M., van Schaftingen, E., Beaufay, H., 1996. Cloning and sequencing of rat liver carboxylesterase ES-4 (microsomal palmitoyl-CoA hydrolase). *Biochemical Journal* 313, 821–826.
- Roberts, L.R., Kurosawa, H., Bronk, S.F., Fesmier, P.J., Agellon, L.B., Leung, W.Y., Mao, F., Gores, G.J., 1997. Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 113, 1714–1726.
- Roda, A., Minutello, A., Angellotti, M.A., Fini, A., 1990. Bile acid structure-activity relationship: evaluation of bile acid lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *Journal of lipid research* 31, 1433–1443.

- Rodrigues, C.M., Fan, G., Ma, X., Kren, B.T., Steer, C.J., 1998. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *The Journal of clinical investigation* 101, 2790–2799.
- Rost, D., Kopplow, K., Gehrke, S., Mueller, S., Friess, H., Ittrich, C., Mayer, D., Stiehl, A., 2005. Gender-specific expression of liver organic anion transporters in rat. *European journal of clinical investigation* 35, 635–643.
- Roth, M., Obaidat, A., Hagenbuch, B., 2012. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British journal of pharmacology* 165, 1260–1287.
- Rudman, D., Kendall, F.E., 1957. Bile Acid Content of Human Serum. II. The Binding of Cholanolic Acids by Human Plasma Proteins¹. *The Journal of clinical investigation* 36, 538–542.
- Russell, D.W., 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry* 72, 137–174.
- Sabatini, D.D., Adesnik, M., 2013. Christian de Duve: Explorer of the cell who discovered new organelles by using a centrifuge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 13234–13235.
- Sarenac, T., Mikov, M., 2017. Biosynthesis and biotransformation of bile acids. *Hospital Pharmacology* 4, 469–485.
- Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., Bäckhed, F., 2013. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell metabolism* 17, 225–235.
- Schmidt, S., Moncada, M., Burger, S., Geyer, J., 2015. Expression, sorting and transport studies for the orphan carrier SLC10A4 in neuronal and non-neuronal cell lines and in *Xenopus laevis* oocytes. *BMC neuroscience* 16, 35.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7, 3.
- Schwarz, D.S., Blower, M.D., 2015. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, 79–94.
- Schwarz, M., Russell, D.W., Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2001. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *Journal of lipid research* 42, 1594–1603.

- Sepe, V., Festa, C., Renga, B., Carino, A., Cipriani, S., Finamore, C., Masullo, D., del Gaudio, F., Monti, M.C., Fiorucci, S., Zampella, A., 2016. Insights on FXR selective modulation. Speculation on bile acid chemical space in the discovery of potent and selective agonists. *Scientific Reports* 6.
- Setchell, K.D., Rodrigues, C.M., Clerici, C., Solinas, A., Morelli, A., Gartung, C., Boyer, J., 1997. Bile acid concentrations in human and rat liver tissue and in hepatocyte nuclei. *Gastroenterology* 112, 226–235.
- Shapiro, H., Kolodziejczyk, A.A., Halstuch, D., Elinav, E., 2018. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *The Journal of experimental medicine* 215, 383–396.
- Sheng, L., Jena, P.K., Liu, H.-X., Kalanetra, K.M., Gonzalez, F.J., French, S.W., Krishnan, V.V., Mills, D.A., Wan, Y.-J.Y., 2017. Gender Differences in Bile Acids and Microbiota in Relationship with Gender Dissimilarity in Steatosis Induced by Diet and FXR Inactivation. *Scientific Reports* 7, 1748.
- Shneider, B.L., 2001. Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 32, 407–417.
- Siekevitz, P., 1957. Powerhouse of the cell. *Scientific American*, 131–144.
- Simon, F.R., Fortune, J., Iwahashi, M., Qadri, I., Sutherland, E., 2004. Multihormonal regulation of hepatic sinusoidal Ntcp gene expression. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 287, G782-94.
- Skulachev, V.P. Programmed Death Phenomena at Various Levels of Development of the Living Systems, *Formal Descriptions of Developing Systems* 61 – 86.
- Slijepcevic, D., Kaufman, C., Wichers, C.G.K., Gilglioni, E.H., Lempp, F.A., Duijst, S., Waart, D.R. de, Elferink, R.P.J.O., Mier, W., Stieger, B., Beuers, U., Urban, S., van de Graaf, S.F.J., 2015. Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus pres1-binding in na(+)-taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology* 62, 207–219.
- Smith, J.J., Aitchison, J.D., 2013. Peroxisomes take shape. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 803–817.
- Solaas, K., Ulvestad, A., Söreide, O., Kase, B.F., 2000. Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *Journal of lipid research* 41, 1154–1162.
- Song, X., Kaimal, R., Yan, B., Deng, R., 2008. Liver receptor homolog 1 transcriptionally regulates human bile salt export pump expression. *Journal of lipid research* 49, 973–984.

- Soroka, C.J., Ballatori, N., Boyer, J.L., 2010. Organic Solute Transporter, OST α -OST β : Its Role in Bile Acid Transport and Cholestasis. *Seminars in liver disease* 30, 178–185.
- Spinelli, J.B., Haigis, M.C., 2018. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology* 20, 745–754.
- Stadler, J., Stern, H.S., Yeung, K.S., McGuire, V., Furrer, R., Marcon, N., Bruce, W.R., 1988. Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 29, 1326–1331.
- Statovci, D., Aguilera, M., MacSharry, J., Melgar, S., 2017. The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Frontiers in immunology* 8, 838.
- Steinberg, S.J., Mihalik, S.J., Kim, D.G., Cuebas, D.A., Watkins, P.A., 2000. The human liver-specific homolog of very long-chain acyl-CoA synthetase is cholate:CoA ligase. *The Journal of biological chemistry* 275, 15605–15608.
- Stieger, B., Hagenbuch, B., Landmann, L., Höchli, M., Schroeder, A., Meier, P.J., 1994. In situ localization of the hepatocytic Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107, 1781–1787.
- Stieger, B., Meier, Y., Meier, P.J., 2007. The bile salt export pump. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 611–620.
- Styles, N.A., Shonsey, E.M., Falany, J.L., Guidry, A.L., Barnes, S., Falany, C.N., 2016. Carboxy-terminal mutations of bile acid CoA:N-acyltransferase alter activity and substrate specificity. *Journal of lipid research* 57, 1133–1143.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., Lochs, H., 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122, 44–54.
- Takahashi, S., Fukami, T., Masuo, Y., Brocker, C.N., Xie, C., Krausz, K.W., Wolf, C.R., Henderson, C.J., Gonzalez, F.J., 2016. Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *Journal of lipid research* 57, 2130–2137.
- Tempel, W., Grabovec, I., MacKenzie, F., Dichenko, Y.V., Usanov, S.A., Gilep, A.A., Park, H.-W., Strushkevich, N., 2014. Structural characterization of human cholesterol 7 α -hydroxylase. *Journal of lipid research* 55, 1925–1932.
- Thakare, R., Alamoudi, J.A., Gautam, N., Rodrigues, A.D., Alnouti, Y., 2018. Species differences in bile acids I. Plasma and urine bile acid composition. *Journal of applied toxicology* 38, 1323–1335.

- Thomas, C., Auwerx, J., Schoonjans, K., 2008. Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5--connecting nutrition and metabolism. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 18, 167–174.
- Tillander, V., Alexson, S.E.H., Cohen, D.E., 2017. Deactivating Fatty Acids: Acyl-CoA Thioesterase-Mediated Control of Lipid Metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism* 28, 473–484.
- Trülsch, D., Greim, H., Czygan, P., Hutterer, F., Schaffner, F., Popper, H., Cooper, D.Y., Rosenthal, O., 1973. Cytochrome P-450 in 7-hydroxylation of taurodeoxycholic acid. *Biochemistry* 12, 76–79.
- Tsujita, T., Okuda, H., 1993. Palmitoyl-coenzyme A hydrolyzing activity in rat kidney and its relationship to carboxylesterase. *Journal of lipid research* 34, 1773–1781.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The human microbiome project. *Nature* 449, 804–810.
- Ursell, L.K., Metcalf, J.L., Parfrey, L.W., Knight, R., 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition reviews* 70 Suppl 1, 38-44.
- Vahtovuo, J., Munukka, E., Korkeamäki, M., Luukkainen, R., Toivanen, P., 2008. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 35, 1500–1505.
- Vacca, F., Scott, C., Gruenberg, J., 2016. The Late Endosome. *Encyclopedia of Cell Biology*, pp. 201–210.
- van de Steeg, E., Wagenaar, E., van der Kruijssen, C.M.M., Burggraaff, J.E.C., Waart, D.R. de, Elferink, R.P.J.O., Kenworthy, K.E., Schinkel, A.H., 2010. Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs. *The Journal of clinical investigation* 120, 2942–2952.
- van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I., Tabak, H.F., 2012. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* 149, 397–409.
- Vassileva, G., Hu, W., Hoos, L., Tetzloff, G., Yang, S., Liu, L., Kang, L., Davis, H.R., Hedrick, J.A., Lan, H., Kowalski, T., Gustafson, E.L., 2010. Gender-dependent effect of Gpbar1 genetic deletion on the metabolic profiles of diet-induced obese mice. *The Journal of endocrinology* 205, 225–232.

- Villarroel-Campos, D., Gastaldi, L., Conde, C., Caceres, A., Gonzalez-Billault, C., 2014. Rab-mediated trafficking role in neurite formation. *Journal of neurochemistry* 129, 240–248.
- Wagner, M., Halilbasic, E., Marschall, H.-U., Zollner, G., Fickert, P., Langner, C., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner, M., 2005. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology* 42, 420–430.
- Wagner, M., Zollner, G., Trauner, M., 2009. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *Journal of hepatology* 51, 565–580.
- Wahlström, A., Al-Dury, S., Ståhlman, M., Bäckhed, F., Marschall, H.-U., 2017. Cyp3a11 is not essential for the formation of murine bile acids. *Biochemistry and biophysics reports* 10, 70–75.
- Wang, Y.-D., Chen, W.-D., Yu, D., Forman, B.M., Huang, W., 2011. The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor κ light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice. *Hepatology* 54, 1421–1432.
- Ward, N.L., Pieretti, A., Dowd, S.E., Cox, S.B., Goldstein, A.M., 2012. Intestinal aganglionosis is associated with early and sustained disruption of the colonic microbiome. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 24, 874-400.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Matakai, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A.C., Auwerx, J., 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484–489.
- Wheeler, D.A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y.-J., Makhijani, V., Roth, G.T., Gomes, X., Tartaro, K., Niazi, F., Turcotte, C.L., Irzyk, G.P., Lupski, J.R., Chinault, C., Song, X.-z., Liu, Y., Yuan, Y., Nazareth, L., Qin, X., Muzny, D.M., Margulies, M., Weinstock, G.M., Gibbs, R.A., Rothberg, J.M., 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452, 872–876.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474-6, 478-81.
- Winston, J.A., Theriot, C.M., 2016. Impact of microbial derived secondary bile acids on colonization resistance against *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract. *Anaerobe* 41, 44–50.

- Wong, M.H., Oelkers, P., Craddock, A.L., Dawson, P.A., 1994. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *The Journal of biological chemistry* 269, 1340–1347.
- Wong, M.H., Oelkers, P., Dawson, P.A., 1995. Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *The Journal of biological chemistry* 270, 27228–27234.
- Wong, M.H., Rao, P.N., Pettenati, M.J., Dawson, P.A., 1996. Localization of the ileal sodium-bile acid cotransporter gene (SLC10A2) to human chromosome 13q33. *Genomics* 33, 538–540.
- Wynder, E.L., Shigematsu, T., 1967. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 20, 1520–1561.
- Xu, G., Salen, G., Shefer, S., Ness, G.C., Nguyen, L.B., Parker, T.S., Chen, T.S., Zhao, Z., Donnelly, T.M., Tint, G.S., 1995. Unexpected inhibition of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholesterol in New Zealand white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *The Journal of clinical investigation* 95, 1497–1504.
- Yamashita, H., Kuroki, S., Nakayama, F., 1989. Deoxycholate 7 alpha-hydroxylase in the hamster: substrate specificity and effect of phenobarbital. *Journal of lipid research* 30, 711–718.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., Li, W., 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 1, e00049.
- Zhang, F., Duan, Y., Xi, L., Wei, M., Shi, A., Zhou, Y., Wei, Y., Wu, X., 2018. The influences of cholecystectomy on the circadian rhythms of bile acids as well as the enterohepatic transporters and enzymes systems in mice. *Chronobiology international* 35, 673–690.
- Zhang, Y., Li, F., Patterson, A.D., Wang, Y., Krausz, K.W., Neale, G., Thomas, S., Nachagari, D., Vogel, P., Vore, M., Gonzalez, F.J., Schuetz, J.D., 2012. Abcb11 Deficiency Induces Cholestasis Coupled to Impaired β -Fatty Acid Oxidation in Mice*. *The Journal of biological chemistry* 287, 24784–24794.
- Zhang, Y.-K.J., Guo, G.L., Klaassen, C.D., 2011. Diurnal variations of mouse plasma and hepatic bile acid concentrations as well as expression of biosynthetic enzymes and transporters. *PloS one* 6, e16683.
- Zhou, H., Hylemon, P.B., 2014. Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids* 86, 62–68.

Zollner, G., Marschall, H.-U., Wagner, M., Trauner, M., 2006. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Molecular pharmaceutics* 3, 231–251.

7 Anhang

Tabelle 7-1: Hydroxylierungsstatus der Gallensäuren in der Galle, dem peripheren Blut und dem Kot

Die konjugations-unabhängigen Anteile der einzelnen Gallensäuren sind tabellarisch getrennt für männliche und weibliche *Slc10a5^{+/+}* Wildtyp- und *Slc10a5^{-/-}* Knockout-Mäuse dargestellt. Angegeben sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung in Prozent. Die Berechnung der gezeigten Werte erfolgte durch Summierung der Konzentrationen der Taurin-, Glycin- und unkonjugierten Formen jeder einzelnen Gallensäure. Diese Werte wurden dann in ihren prozentualen Anteil am Gallensäurepool von Galle, peripherem Blut und Kot umgerechnet.

	Gallensäuregruppe	Männchen				Weibchen			
		<i>Slc10a5^{+/+}</i>		<i>Slc10a5^{-/-}</i>		<i>Slc10a5^{+/+}</i>		<i>Slc10a5^{-/-}</i>	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Galle	α -MCA	9	4	8	3	10	6	8	1
	β -MCA	23	4	16	6	19	3	19	2
	HCA	0	0	0	0	0	0	0	0
	CA	57	5	64	5	51	4	57	4
	UDCA	4	1	3	1	6	1	5	1
	HDCA	1	0	1	0	1	0	1	0
	CDCA	3	1	3	1	4	1	4	1
	DCA	2	0	5	2	7	2	6	1
	LCA	0	0	0	0	0	0	0	0
peripheres Blut	α -MCA	5	3	3	1	6	1	7	2
	β -MCA	13	2	7	4	16	5	13	5
	HCA	0	0	0	1	0	0	0	0
	CA	63	6	62	7	41	10	45	8
	UDCA	5	2	2	1	5	2	5	2
	HDCA	2	1	3	1	2	1	3	1
	CDCA	3	1	3	1	2	1	2	0
	DCA	9	4	20	6	27	11	25	8
	LCA	0	0	0	0	0	0	0	0

Kot	α -MCA	23	6	17	5	23	3	29	5
	β -MCA	20	8	7	5	20	9	12	5
	HCA	3	1	3	1	3	2	3	1
	CA	21	9	13	5	16	13	9	7
	UDCA	1	1	1	0	1	0	1	0
	HDCA	4	2	6	3	3	2	7	2
	CDCA	0	0	0	0	0	0	0	0
	DCA	28	10	53	11	34	12	38	6
	LCA	0	0	0	0	0	0	0	0

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit hätte ohne die Unterstützung zahlreicher Personen in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Geyer, der stets ein offenes Ohr und eine offene Tür für neue Ideen und Wege hatte. In einer Vielzahl von Diskussionen wusste er stets die wissenschaftliche Neugier, die ein solches Projekt antreibt, aufrecht zu erhalten und in Zeiten schwieriger Versuche und negativer Ergebnisse die richtigen Worte zur weiteren Motivation zu finden.

An zweiter Stelle möchte ich mich bei meinem Post-Doc, Zimmerpartner und Kollegen Dr. Gary Grosser bedanken. Sowohl auf fachlicher Ebene, durch seine Unterstützung und Bereitschaft, sich in jede noch so kleine Fragestellung einzudenken, als auch auf der persönlichen Ebene, zusammen mit der Aufrechterhaltung der kulinarischen Vielfalt der Mittagspause, hat er die Fertigstellung dieser Arbeit mit ermöglicht.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Kornelia Ziegler und Frau Prof. Dr. Melanie Hamann für ihre Hilfe und ihre stets offene Tür.

Weitere Personen denen ich danken möchte sind Herr Prof. Dr. Eder vom Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, der es mir ermöglicht hat die kalorimetrische Analyse der Kotproben durchzuführen, Herr Dr. Herebian vom Stoffwechsellabor in Düsseldorf für die massenspektrometrische Analyse der Gallensäuren und Frau Dr. Fietz vom Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie für die histologische Färbung der Mausgewebe.

Das Arbeiten am Institut wäre undenkbar ohne das „Trio-Infernale“ gewesen. Bärbel Fühler (die Herrin der Mäuse), Regina Leidolf (für die ein RIN-Wert unter 10 keine Option ist) und Anita Neubauer (die Bezwingerin des Chaos) waren die Grundpfeiler jedweder Arbeit am Institut. Vielen Dank für eure Hilfe und vor allem für eure Geduld mit mir.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Jörg, Klaus, Birgit und Herr Zimmermann für ihre Hilfe und stets gute Gespräche auf den Fluren bedanken.

Dann wäre da ja auch noch die Basis des Instituts. An erster Stelle der Nahrungskette dieser Basis steht Dr. Simon Müller. Kritisches Betrachten von Versuchsergebnissen und reger wissenschaftlicher Austausch sind die Grundvoraussetzung solch einer Dissertation. Wenn man den „Labor-Polizisten“ nach all dieser Zeit zusätzlich auch noch als einen Freund benennen kann, hat dies ein ganz großes Danke verdient.

Werte Lady Dr. Josefine Bennien. Es ist nicht möglich in einem kurzen Absatz auszudrücken, wie viel mir unsere gemeinsame Doktorarbeits-Zeit bedeutet hat. Von der zangengestützten Ethanolbetankung bis hin zur Aufgabe als Arachniden-bekämpfender Personenschützer war alles dabei. Die aufregende Phase nach dem Studium mit einem guten Freund gemeinsam anzupacken war das Beste was mir passieren konnte.

Und dann wären da ja noch all die anderen, die das Leben und Arbeiten um und an der Doktorarbeit zu etwas Besonderem gemacht und nicht minder zum Erfolg eben dieser beigetragen haben. Selbst säckeweise Mäusekot, der in Feinst-Arbeit sortiert werden musste, konnte euch alle nicht davon abhalten. Ich möchte mich daher bei Nina „Dekofee“ Schneider, Daniela „Vigilanz“ Gäns, Matthias „II“ Gorecki, Dajana „Hefeschnecke“ Gräfe, Michael „der Traktor“ Kirstgen, Dr. Emre „P7“ Karakus, Kira „Vodka“ Lowjaga, Massimo „Schmassimo“ Palatini und Maria „Schokoladenvernichtungsmaschine“ Wüst bedanken.

Schlussendlich wäre wohl die Entscheidung eine Doktorarbeit überhaupt anzufangen und abzuschließen ohne meine Familie eine andere gewesen. Für die bedingungslose Unterstützung während dieser Zeit und die Hilfe bei der Überwindung von Tälern möchte ich mich zutiefst bei meinen Eltern Barbara und Herbert und meiner Schwester Julia bedanken. Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich meinem Cousin und fast-schon-Bruder Niklas, der es wusste, immer für den nötigen Ausgleich zu sorgen.

Im Laufe der Arbeit und dem Leben am Institut konnte ich eine Person davon überzeugen, aus dem Kreis der Kollegen in den Kreis der Familie zu treten. Für unzählige müßige Stunden der seelischen Unterstützung und des Korrekturlesens möchte ich mich bei Saskia Noppes bedanken. Ohne ihre Rückendeckung und ihren guten Einfluss wäre ich nicht da wo ich jetzt bin.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

„Untersuchung des Gallensäurestoffwechsels der *Slc10a5* Knockout-Maus“

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Matthias Franz Wilhelm Holtemeyer

ISBN: 978-3-86345-541-5



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de
