

Aus dem Labor für molekulare Hepatologie der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik 2

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

---

**Induktion von FGF19 & FXR in humanen HT-29 Zellen  
unter Verwendung der nukleären Agonisten  
Vitamin D3, Vitamin A & CDCA**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dominic Christian Sutor

aus Altötting

Würzburg, Februar 2016

**Referent:** Prof. Dr. med. Andreas Geier  
**Korreferent:** Frau Prof. Dr. Antje Gohla  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

25.10.2016

**Der Promovend ist Arzt**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<hr/>		
<b>1.1</b>	<b>FIBROBLAST GROWTH FACTORS - FGFS</b>	<b>1</b>
1.1.1	DIE FAMILIE DER FGFS	1
1.1.2	FGF-19	3
1.1.2.1	Allgemeines und Rezeptoren	3
1.1.2.2	Regulation der hepatischen Gallensäuresynthese durch FGF15/19	5
1.1.2.2.1	Gallensäure-Synthese	5
1.1.2.2.2	Regulation der hepatischen Gallensäuresynthese durch FXR	6
1.1.2.2.3	Intestinale Regulation der hepatischen Gallensäuresynthese durch FGF15/19	7
1.1.3	METABOLISCHE STOFFWECHSELREGULATIONEN DURCH FGF15/19	9
1.1.3.1	Regulation des Kohlenhydratmetabolismus	10
1.1.3.2	Regulation des hepatischen Lipidstoffwechsels	12
<b>1.2</b>	<b>NUKLEÄRE REZEPTOREN UND IHRE AGONISTEN</b>	<b>13</b>
1.2.1	ALLGEMEINES	13
1.2.2	VITAMIN D & VITAMIN D REZEPTOR/VDR	15
1.2.3	VITAMIN A & VITAMIN A REZEPTOREN/ RAR/RXR	17
<b>1.3</b>	<b>REGULATION DES INTESTINALEN FGF19-GENS DURCH NUKLEÄRE REZEPTOREN UND DEREN AGONISTEN IN HUMANE DARMZELLEN</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>21</b>
<hr/>		
<b>2.1</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>21</b>
2.1.1	MEDIEN/ ZUSÄTZE/ KITS	21
2.1.2	GERÄTE	23
2.1.3	ZELLREIHEN UND PRIMER	24
2.1.4	KULTURMEDIEN	25
2.1.4.1	Zellkulturstimulation	26
2.1.4.2	Western Blot Materialien	26
<b>2.2</b>	<b>METHODEN &amp; PROTOKOLLE</b>	<b>28</b>
2.2.1	AUFTAUEN	28
2.2.2	KULTIVIERUNG	28
2.2.3	VERSUCHSABLÄUFE	29

2.2.4	RNA-GEWINNUNG & -QUANTIFIZIERUNG	30
2.2.5	cDNA-SYNTHESE/ RT-PCR	31
2.2.6	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	32
2.2.6.1	Allgemeines:	32
2.2.6.2	Quantitative Real-time PCR (rtPCR)	34
2.2.6.3	SYBR-Green Funktionsweise	34
2.2.6.4	Nachteile von SYBR® Green	34
2.2.6.5	Melting-Curve	34
2.2.6.6	Ergebnisauswertung und Berechnung;	35
2.2.7	WESTERN BLOT	35
2.2.7.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	36
2.2.7.2	Transfer auf die Nitrocellulose-Membran/ Blotting	37
2.2.7.3	Detektion des Antigens mit spezifischen Antikörpern	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>VERGLEICH DER HUMANEN DARMZELLINIEN CACO-2 UND HT-29</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>KONZENTRATIONSABHÄNGIGER EFFEKT VON CDCA, VD3 UND 9-CIS RA AUF DIE FGF19- GENEXPRESSION IN HT-29</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>ZEITABHÄNGIGE INDUKTION VON FGF19</b>	<b>41</b>
3.3.1	1,25 (OH) VITAMIN D3	41
3.3.2	9-CIS RA UND CDCA ALS SEPARATE INDUKTOREN	42
3.3.3	SYNERGISMUS VON RA UND CDCA	44
<b>3.4</b>	<b>URSACHEN DES SYNERGISMUS</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>STUDIEN ZUR GENEXPRESSION</b>	<b>48</b>
<b>3.6</b>	<b>SPEZIFISCHE RXR/RAR-AGONISTEN</b>	<b>50</b>
3.6.1	DIE ROLLE DES RAR IN DER FGF19-AKTIVIERUNG	51
3.6.2	DIE ROLLE DES RXR IN DER FXR-AKTIVIERUNG	52
<b>3.7</b>	<b>ERGEBNISSESYNOPSIS</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>SELEKTION DER VERSUCHSZELLEN</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>VERSUCHE UND BEOBACHTUNGEN</b>	<b>56</b>

4.2.1	VITAMIN D EFFEKTE UND FOLGERUNGEN	56
4.2.2	EINFLÜSSE DES CDCA AUF FXR UND FGF19	58
4.2.3	VITAMIN A ALS NEUARTIGER FGF19 REGULATOR	59
4.2.4	NEUE ERKENNTNISSE ZUM EINFLUSS DER RXR/RAR-ACHSE AUF DIE REGULATION DES HUMANEN <i>FGF19</i> GENS UND UNTERSCHIEDE ZUM MURINEN SYSTEM	62
<b>4.3</b>	<b>STÄRKEN UND SCHWÄCHEN</b>	<b>65</b>
<b>4.4</b>	<b>ZUKÜNFTIGE STUDIEN</b>	<b>67</b>
<b>4.5</b>	<b>KLINISCHE BEDEUTUNG UND ANWENDBARKEIT</b>	<b>69</b>
4.5.1	CHOLOGENE DIARRHÖ – BILE ACID DIARRHOEA (BAD)	69
4.5.2	METABOLISCHES SYNDROM	70
4.5.3	ADIPOSITAS	71
4.5.4	NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)	72
4.5.5	THERAPEUTISCHE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN	73
4.5.6	NEBENWIRKUNGEN DES FGF19	74
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>QUELLENVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>

*“There is a theory which states that if ever anybody discovers exactly what the Universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable.*

*There is another theory which states that this has already happened. “*

*D. Adams*

# **1 Einleitung**

## **1.1 Fibroblast growth factors - FGFs**

### **1.1.1 Die Familie der FGFs**

Bereits bis ins Jahr 1939 lässt sich die erste Beobachtung der Fibroblast growth factors, kurz FGFs, zurückdatieren. Trowell und Willmer konnten damals vor mehr als 75 Jahren erstmals direkt deren proliferativen Effekt auf fibroblastische Zellkulturen beobachten und beschreiben. Bei der Zugabe von unterschiedlichen Geweben, u.a. Biopsien aus Fohlengehirnen, zu in vitro gezüchteten Periost-Fibroblasten, konnten sie eine starke wachstumsfördernde Wirkung verzeichnen. Weitere detailliertere Einsichten in diese neuentdeckten Prozesse sollten allerdings noch auf sich warten lassen [1, 2].

Mitte der 1960er wurde in den damals weltweit verwendeten HeLa-Zellen ein noch unbekannter Stoff beschrieben, der es dem Anschein nach ermöglichte, Fibroblasten-ähnliche Zellkulturen zu züchten und kultivieren. Dieser noch nicht klassifizierten Substanz schrieb man rasch mehrere Eigenschaften zu wie z.B.: eine hohe Temperaturtoleranz oder eine Aktivitätsminderung durch saure oder basische Hydrolyse [3].

Ein Jahrzehnt später konnte man FGFs erstmals aus Rinderhypophysen isolieren [4, 5]. Man nahm an, dass es sich lediglich um Mitogene handelte, die einen direkten Einfluss auf Fibroblasten haben. Dadurch ergab sich der Name FGF – fibroblast growth factor, für eine Familie neuartiger Stoffe, die über die folgenden Jahrzehnte bis heute mehr und mehr ihrer vielseitigen Fähigkeiten, Wirkungen und Aufgaben preisgeben würden.

Heute ist bekannt, dass es sich bei FGFs um facettenreiche Proteine handelt, die wichtigen Funktionen in entscheidenden Stoffwechselfvorgängen, sowie Aufgaben in der Entwicklung und Regeneration eines Organismus einnehmen [6].

Im Verlauf der Reifung und Entwicklung eines Organismus erfolgt ein Wechsel ihrer Eigenschaften und Bestimmungen. Während den FGFs in der embryologischen Reifung, die Regulationen von Zellproliferation, -migration und -differenzierung zukommt, übernehmen sie im reifen System/Organismus geweberegenerierende und homöostatische Aufgaben, wie zum Beispiel dem Wachstum neuer Blutgefäße, der sog. Angiogenese [7, 8].

In der heute bekannten FGF-Familie finden sich 22 Vertreter, die sich in drei Hauptgruppen einteilen lassen. Dabei unterscheidet man klassische, intrazelluläre und hormonähnliche FGFs [6]. Des Weiteren kann man FGFs anhand ihrer genetischen Sequenzübereinstimmung und ihrer evolutionären Entwicklung in diverse Untergruppen einteilen [9]. Ihre molekularen Massen reichen von 17 bis 34 kDa und sie bestehen durchschnittlich aus ca. 150-300 Aminosäuren mit vereinzelt Übereinstimmungen von bis zu 85% in ihren Sequenzen [7, 10].

Eine Ausnahme bilden die FGFs 11-14, da sie bereits als Fibroblast Homologous factors (FHF) aufgeführt und nur noch aus historischen Gründen zu den FGFs gerechnet werden. Zwar zeigt sich in allen FHF eine große Kongruenz in ihrer Basensequenz und Struktur und auch Heparin wird mit einer starken Affinität gebunden, jedoch besitzen sie keinerlei Affinität zu den auf der Zelloberfläche befindlichen klassischen FGF-Rezeptoren. Die FHF binden an intrazelluläre, spannungsgesteuerte Na<sup>+</sup>-Kanäle und neuronale MAP-Kinasen, wodurch sich ihre biochemischen Eigenschaften und Funktionen grundlegend von denen der echten FGFs unterscheiden [9, 11].

Zur evolutionären Entwicklung der FGFs lässt sich anmerken, dass sich im Genom von Einzellern keine der für FGF kodierenden Gene finden. Erst in mehrzelligen Organismen, wie den Fadenwürmern, konnten zwei der verantwortlichen Gene nachgewiesen werden. Ausschließlich in Wirbeltieren treten alle derzeit bekannten für FGFs codierenden Gene und deren FGF-Rezeptoren (FGFRs) auf, was die Vermutung nahe stellt, dass sich die Evolution der FGFs, sowie die der Wirbeltiere ab einem bestimmten Zeitpunkt simultan oder zumindest parallel abgespielt haben könnte [8].

## **1.1.2 FGF-19**

### **1.1.2.1 Allgemeines und Rezeptoren**

Im humanen Genom finden sich 22 der bis dato bekannten FGF-Gene 1-23. Einzig das für Fgf15 kodierende Gen lässt sich nicht in der menschlichen DNA nachweisen. Interessanterweise konnte man dieses Gen ausschließlich in Nagern, jedoch nicht im Menschen nachweisen, während FGF19 wiederum nur im Menschen und nicht in Mäusen vorzukommen scheint. Beide stimmen lediglich in 51% ihrer Basensequenz überein, zeigen allerdings in der Expression ihrer mRNAs zahlreiche Übereinstimmungen so wie ein hohes Maß an funktioneller Redundanz [12-14]. Deshalb werden das humane FGF19 und das Maus-Fgf15 aufgrund ihrer gemeinsamen Abstammung, als orthologe Gene verstanden. Da die Maus eines der am meist genutzten Versuchstiere zur Generforschung ist, wird in der wissenschaftlichen Literatur gemeinhin der Begriff FGF15/19 verwendet und so auch in dieser Arbeit [6, 8].

FGF15/19-Transkripte konnten bereits in den verschiedensten Geweben wie z.B.: fetalen Knorpeln, Haut oder auch Retinas nachgewiesen werden. Allerdings erscheint ihr jedoch wichtigster Produktionsort im ausgewachsenen Organismus der Dünndarm und hier führend das Ileum zu sein [14, 15].

FGF15/19 bildet zusammen mit FGF21 und FGF23 die Untergruppe der hormonähnlichen FGFs, die sich von allen anderen FGFs hinsichtlich mehrerer Aspekte wesentlich unterscheidet [9].

Einer der grundlegenden Unterschiede dieser FGF-Untergruppe, zu ihren restlichen Familienmitgliedern, zeigt sich in deren Bindungsverhalten zu Heparin und folglich ihrer FGF-Rezeptoren-Affinität. Während die üblichen FGFs auf Heparin angewiesen sind, um eine funktionelle FGF-Rezeptorbindung zu ermöglichen, besitzen die hormonähnlichen FGFs keine dieser typischen heparinbindenden Zentren. Dadurch können sich diese Faktoren, unabhängig von Heparin, zwar leichter im Körper bewegen und verteilen, jedoch ist ihre Rezeptoraffinität dadurch reduziert [16]. Herkömmliche FGFs zeigen durch ihre

rasche Bindung an Heparin vor allem parakrine und/oder autokrine Wirkungsmuster, die FGF15/19-Gruppe fungiert durch den beschriebenen Mangel derartiger Zentren auch als endokrine Hormone [17].

Der typische FGF-Rezeptor ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der aus fünf unterschiedlichen Immunglobulindomänen besteht. Einer intrazellulären, einer transmembranen und drei extrazellulären D1-3-Domänen [18]. Ihre Spezifität erhalten die FGFR 1-3 durch alternatives Splicing der D3-Domäne [19, 20].

Auffallend in der Gruppe der bekannten FGFRs ist die Tatsache, dass FGFR1-3 eine Vielzahl der FGFs binden können, während FGFR 4 nach derzeitigem Wissensstand ausschließlich FGF15/19 bindet. FGFR4 selbst ist der am häufigsten vorkommende Rezeptorisotyp in parenchymalen Leberzellen (sog. Hepatozyten) [21].

Doch wie können FGF15/19, 21 und 23 trotz ihres offensichtlichen Affinitätsdefizits, dennoch die diversen und vielseitigen Zellreaktionen auslösen, die Ihnen zugeschrieben werden?

Erklären lässt sich diese Tatsache durch einen synergistischen Effekt der FGF-Rezeptoren und der für diese Untergruppe spezifischen Kofaktoren, den so genannten Klothos.

Um an den FGF-Rezeptor effizient zu binden, ihn zu dimerisieren und aktivieren, benötigen die hormonähnlichen FGFs spezifische Transmembranproteine, die als Mediator zwischen FGF und FGFR vermitteln und die Affinität erhöhen bzw. herstellen. Hierbei handelt es sich um drei Vertreter der Klotho-Protein-Familie: Lactase-like- sowie  $\alpha$ - &  $\beta$ -Klotho. Diese Kofaktoren bestimmen durch ihre begrenzte Anzahl und ihr Vorkommen auf spezifischen Geweben ganz entscheidend die eigentlichen Effekte der FGF19, 21 und 23 [16]. Während  $\alpha$ -Klotho mit FGF23 interagiert, dient speziell  $\beta$ -Klotho als Mediator für FGF15/19 sowie FGF21 [22-24]. Im Mausmodell wird vorwiegend in Leber-, Pankreas und Fettgewebe  $\beta$ -Klotho exprimiert [25].

Kuroso et. al. konnten 1997 in Mäusen die schwerwiegende Bedeutung eines intakten bzw. mutierten Klotho-Gens nachweisen. Ein Gendefekt führte in den Versuchstieren zur vorzeitigen Alterung und deren Folgen wie z.B.: einer verkürzten Lebensdauer, Unfruchtbarkeit, Arteriosklerose, Hautatrophien und Osteoporose [26].

Aus der obigen Erörterungen soll ersichtlich werden, dass die gewebespezifische Wirkung der hormonähnlichen FGFs durch die gleichzeitige Expression ihrer spezifischen FGF-Rezeptoren und entsprechender Klothos in den potentiellen Zielorganen bestimmt wird. Eines der Hauptzielorgane von FGF15/19 ist die Leber, die vor allem FGFR4/ $\beta$ -Klotho exprimiert. Als weiteres Zielorgan von FGF15/19 wurde zudem das Fettgewebe identifiziert, wobei seine Wirkung hier vor allem durch FGFR1c/ $\beta$ -Klotho vermittelt wird [27, 28]. Im folgenden Abschnitt dieser Einleitung sollen die grundlegenden physiologischen Funktionen von FGF15/19 beschrieben werden und der Fokus auf die leberspezifischen Aspekte gerichtet sein.

### **1.1.2.2 Regulation der hepatischen Gallensäuresynthese durch FGF15/19**

#### **1.1.2.2.1 Gallensäuresynthese**

Eine der zahlreichen und wichtigen Aufgaben des Stoffwechsellmultitalents Leber besteht in der Produktion, Speicherung und Sekretion von Galle. Diese wiederum dient mehreren Zwecken wie z.B.: der Verdauung von Nahrungsfetten und als Ausscheidungsweg schwer in Wasser löslicher und somit nicht renal ausscheidbarer Substanzen. In den Hepatozyten werden täglich insgesamt ca. 700 ml Galle produziert, deren Hauptbestandteil die sog. Gallensäuren bilden. Sie entstehen durch eine Reihe enzymatischer Alterationen, als wichtige Endprodukte des hepatischen Cholesterinstoffwechsels. Diese Synthese und die daraus resultierende Exkretion der Gallensäure, stellen den wichtigsten Ausscheidungsweg für Cholesterin im menschlichen Körper dar.

Eine der Hauptaufgaben der Gallensäure in der Verdauung ist die verbesserte Löslichkeit und von Nahrungsfetten im Dünndarm. Durch diese Emulgierung werden die fettspaltenden Prozesse der Lipasen erleichtert und beschleunigt. Da sie ein für den Körper kostbares Gut darstellen, werden 90-95% der in das Lumen sezernierten Gallensäuren im terminalen Ileum über den enterohepatischen Kreislauf wiedergewonnen und erneut zur Verfügung gestellt.

Für die Gallensäuresynthese gibt es zwei potenzielle Produktionswege; einen klassischen bzw. neutralen sowie einen alternativen. Beide entscheiden sich hinsichtlich der katalysierenden Enzyme und der End- bzw. Zwischenprodukte. Im klassischen Weg ist die Cholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) das Schlüsselenzym einer umfassenden Kaskade, deren Endprodukte die Cholsäure und die Chenodesoxycholsäure darstellen. Dieser Weg findet ausschließlich in Hepatozyten statt. Der alternative Weg kann in allen Geweben ablaufen, in denen die dazu benötigten Enzyme vorliegen. Das Schlüsselenzym ist die mitochondriale Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1) [29].

Zusammengefasst werden mehr als 14 Enzyme benötigt, um aus Cholesterin eine primäre Gallensäure herzustellen. Durch erneute enzymatische Dekonjugation entstehen im Darmlumen die sekundären Gallensäuren [30, 31].

Auf dem klassischen Weg wird über negatives Feedback, durch die Gallensäuren selbst, die Expression des für Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) kodierenden Gens unterdrückt. Somit limitiert und kontrolliert sich die Schlüsselstelle der Gallensäuresynthese selbst [32, 33].

Einen Dreh- und Angelpunkt dieser mindernden Eigenregulation bildet der intestinal sowie hepatisch vorkommende Farnesoid X Rezeptor (FXR).

#### **1.1.2.2 Regulation der hepatischen Gallensäuresynthese durch FXR**

Selbstverständlich stehen derart wichtige Stoffwechselprozesse, wie der oben beschriebene, unter strenger Kontrolle und Regulation, um eine Entgleisung in toxisch hohe bzw. niedrige Bereiche zu vermeiden.

Der Farnesoid X Rezeptor alpha/FXR $\alpha$  ist ein unverzichtbarer Regulator für eine Vielzahl von Genen, die für die Homöostase im Gallensäure- und Fettstoffwechsel zuständig sind. FXR ist Mitglied einer Superfamilie aus 48 Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren, die als nukleären Rezeptoren bezeichnet werden [34, 35]. Vorwiegend exprimiert wird FXR in der Leber und im Darmgewebe [36, 37].

Die Hauptliganden des FXR sind die in der Leber produzierten Gallensäuren. Die CDCA (chenodeoxycholic acid) besitzt hierbei von allen die größte Aktivierungspotenz für den humanen FXR. Bis heute jedoch konnten bereits mehr als 80 weitere Verbindungen entdeckt werden, die an den FXR mit unterschiedlichen Affinitäten und Auswirkungen binden, wie z.B.: Androsteron, einem Metaboliten des Sexualhormons Testosteron [34, 35, 38, 39].

Durch den aktivierten FXR in der Leber kommt es zur Transkription von SHP (small heterodimer partner), einen Angehörigen der „orphan nuclear receptor“-Gruppe (ONR). SHP wiederum tritt in Verbindung mit einem weiteren ONR, dem LRH-1 (Liver Receptor homolog-1). Ungebunden übernimmt freies LRH1 eine Promoter-Aktivierung des CYP7A1-Gens und würde zu einer Mehrproduktion an Gallensäuren bildenden Enzymen führen. Durch die Bindung von SHP wird dieser LRH1-abhängige Prozess gehemmt und die Transkription von CYP7A1 reduziert [40, 41].

In Mäusen deren SHP-Produktion genetisch ausgeschaltet wurde, konnten Kerr et al. & Wang et al. dessen Einfluss demonstrieren, da die Nager verstärkt CYP7A1 exprimierten und verglichen mit wildtypischen Tieren mehr Gallensäure produzierten und speicherten [42-45].

### **1.1.2.2.3      *Intestinale Regulation der hepatischen Gallensäuresynthese durch FGF15/19***

Neben der oben erläuterten Syntheseregulation in der Leber gibt es noch weitere intestinale Feedback-Mechanismen, in denen der FXR $\alpha$ -FGF15/19-Achse eine tragende Rolle zukommt. Um toxischen Gallensäurespiegel zu

vermeiden, kontrolliert FXR $\alpha$  auch die Biotransformation von Gallensäuren zu Galle und deren geregelter Ausscheidung [37].

Durch ihre lipophilen Eigenschaften kann die Gallensäure, nach postprandialer Abgabe in das Darmlumen, neben spezifischen Transportsystemen wie z.B. ASBT (Apical Sodium-dependent Bile Salt Transport), leicht durch die Membranen der Darmepithelzellen diffundieren und im Zellkern als FXR-Ligand fungieren. Durch den aktivierten FXR kommt es ein bis zwei Stunden postprandial zu einer gesteigerten Expression des FGF15/19-Gens und folgend zu einer erhöhten Produktion und Sekretion von FGF15/19 [46]. Über den Blutweg erreicht das endokrine Protein rasch die Leber.

Die folgende Erkenntnisse über die Signalwege und Wirkweisen wurden vor allem durch die Experimente von Holt et al. 2003 erforscht und zusammengetragen. In einem ersten Versuchsaufbau wurden humane Hepatozyten zuerst mit dem selektiven synthetischen FXR-Agonisten GW4064 [47, 48], dann mit verschiedenen Konzentrationen an GW4064 und CDCA behandelt. Während in den Kontrollgruppen kein Anstieg an FGF19 mRNA verzeichnet wurde, zeigte sich ein starker, dosisabhängiger Anstieg der FGF19-mRNA in den behandelten Zellen. Die Erwartung, dass es durch FXR-Aktivierung zu einer merkbaren CYP7A1-Unterdrückung kommt, konnte folglich bestätigt werden.

Auf Grund dieser Erkenntnisse nahm man an, dass FGF19 direkt durch FXR reguliert wird. Wie bereits unter 1.1.2.1 beschrieben, binden die FGFs verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, FGF19 hier spezifisch den FGFR4 [14]. Ein Defekt im FGFR4-Gen führte in Mäusen bereits zu einer Erhöhung des CYP7A1 Levels, was auf die große Bedeutung dieses Rezeptors rückschließen lässt [21]. Holt et al. betrachteten als nächstes den Effekt einer FGF19-Behandlung von humanen Hepatozyten und konnte einen gravierenden Rückgang des CYP7A1 verzeichnen. SHP-Level blieben unverändert, weshalb man davon ausging, einen neuartigen SHP-unabhängigen Mechanismus entdeckt zu haben.

Für eine in-vivo Studie wurden Mäuse, die mit konstruierten Adenoviren infiziert wurden, um dadurch FGF19 zu exprimieren, nach drei Tagen untersucht und dabei wurde ebenfalls eine CYP7A1-Verminderung verzeichnet.

Kommt es zur Bindung des FGF19 an seinen Rezeptor, werden mehrere Signalwege und Kinasen wie z.B.: der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK) oder der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) aktiviert. Eine Zugehörigkeit der Phospho-Kinasen wurde bereits von De Fabiani et al. 2001; Gupta et al. 2001 und Wang et al. 2002 dargestellt [43].

Eine reduzierte Aktivität der JNK liegt bei Mäusen mit einem Mangel an FGFR4 vor. Die Tiere zeigen ausserdem höhere Gallensäurewerte durch eine verstärkte CYP7A1-Expression als die entsprechenden Kontrolltiere [21, 45].

Neben den regulatorischen Effekten auf die Gallensäuresynthese scheint FGF15/19 ebenso einen Einfluss auf die Füllung und Entleerung der Gallenblase selbst zu besitzen. In Fgf15 Knock-out-Mäusen wurden fast vollständig leere Gallenblasen entdeckt, die sich nach Applikation von Fgf15 in nur 15 Minuten um das mehr als zehnfache füllten [49].

Durch immer neue Erkenntnisse über die diversen Wechselwirkungen und Zusammenhänge zwischen FGF15/19 und dem Gallensäurezyklus stellen sich zugleich auch zahlreiche neue Fragen. Die wissenschaftliche Erforschung und Beantwortung dieser verspricht viele weitere interessante Einsichten über einen vermeintlich bereits gut erforschten Prozess.

### **1.1.3           Metabolische Stoffwechselregulationen                   durch FGF15/19**

Die Energieversorgung des Körpers ist ein komplexes System, dessen oberstes Gebot eine ausgeglichene Homöostase zwischen kurzzeitigem Energiebedarf und langzeitiger Energiespeicherung ist. Eine kontrollierte und reibungslose Kommunikation zwischen allen beteiligten Organen und Geweben wie z.B. dem Verdauungstrakt, dem endo/exokrinen Pankreas, dem Fettgewebe und zahlreichen anderen Signalgebern und -empfängern ist dafür verantwortlich. Als

einer der Botenstoffe dient FGF15/19 als peripheres, unter anderem auch im ZNS tätiges Hormon.

Eine bemerkenswerte Beobachtung bzgl. FGF19-Spiegeln und der Roux-en-Y-Magenbypass-OP wurde von Pournaras et al. sowie Schreuder et al. gemacht. Beide konnten zeigen, dass in Patienten mit Metabolische Syndrom oder Nicht-Alkoholischer Fettleber, deren FGF19-Serumlevel sich Prä-OP unter denen einer normalgewichtigen Kontrollgruppe befanden, sich diese post-OP erhöhten und normalisierten. Ebenso erhöhten sich die Levels von Inkretin und weiteren Sättigungshormonen [50].

In unterschiedlichen Mausmodellen konnten einige der FGF15/19-Einflüsse demonstriert werden. In Tieren, die zu ihrer Hochfettdiät eine Behandlung mit FGF19 erhielten, konnte keine Gewichtszunahme, erstaunlicher Weise sogar eine Körpergewichtsreduktion nachgewiesen werden. Durch eine erhöhte Fettoxidation stieg ihr Energieumsatz und es kam zu einer gesteigerten Produktion braunen Fettgewebes. Während die unbehandelten Mäuse Diabetes mellitus Typ II entwickelten, zeigte sich in den FGF19 therapierten Nagern keinerlei Anzeichen dieser Stoffwechselkrankheit. Die Blutglukosewerte sowie Serumtriglyzeride und Cholesterol in den FGF19-Mäusen glichen denen der Mäuse mit normaler Diät. Auch in den Stoffwechselhormonen Insulin, Glukagon, Leptin und IGF-1 zeigte sich ein Rückgang [12, 13, 16].

Neben der hepatischen Gallensäuresynthese konnten bereits diverse andere Bereiche des Stoffwechsels identifiziert werden, in denen FGF15/19 einen Einfluss zeigt. Ein kurzer Auszug über zwei dieser Prozesse soll in den nächsten Unterpunkten bündig gezeigt werden.

### **1.1.3.1 Regulation des Kohlenhydratmetabolismus**

Ein weiterer Einflussbereich, neben der beschriebenen hepatischen Gallensäureproduktion, der sicher für FGF15/19 identifiziert werden konnte, ist die Regulation des Glukosestoffwechsels auf der hepatischen sowie in über- und untergeordneten Ebenen. Je nach Nährstoffangebot kann über diese Achse auch die Protein- und Glykogensynthese gesteuert werden [17, 51].

In ihren Mausexperimenten konnten Marcelin et al. darstellen, welchen drastischen Einfluss eine periphere FGF15/19 Injektion auf das zentrale Nervensystem und weiterwirkend auf die Glukosetoleranz bewirkt. Wurden den Testtieren zentrale Injektionen in Hirnventrikel verabreicht, reduzierte sich rasch deren iatrogenes Übergewicht. Einerseits wurde dies durch eine verminderte Futteraufnahme verursacht, was auf ein zentral vermindertes Hungergefühl schließen lässt, andererseits konnte in einem Glucose-Toleranz-Test gezeigt werden, dass sich die Glukosetoleranz in den Versuchstieren mit hochfettthaltigen Diät nachweislich verbesserte [52].

Eine weitere Aufgabe, die dem FGF15/19 zukommt, ähnelt in vielerlei Hinsicht der des blutzuckersenkenden Hormons Insulin. Beide zeigen einen Einfluss auf die hepatische Glukoneogenese, wobei der Insulinanstieg bereits 15 Minuten postprandial und somit 30 Minuten vor dem FGF15/19-Anstieg auftritt. Wie Tomlinson et al. in ihren transgenen Mäusen zeigen konnten, führte die FGF19-Expression in den Tieren zu gesenkten Insulin- und Blutzuckerwerten bei gleichzeitig erhöhter Insulinsensitivität [12].

Neben der Herabregulierung des CYP7A1-Gens konnte beobachtet werden, dass mehrere wichtige Gene und deren Proteinendprodukte ebenfalls vermindert vorkamen. Zu diesen gehörten u.a. Glucose-6-Phosphatase, Cytochrom C und Phosphoenolpyruvatkinase, allesamt wichtig für die Glukoneogenese und weitere Abschnitte des Kohlenhydratstoffwechsels [53].

Ein entscheidendes Element in diesem Prozess ist das sog. CREB – cAMP regulatory element-binding protein. Dieser vielseitig aktivierbare Transkriptionsfaktor modifiziert in der Leber den Stoffwechsel in Phasen mit geringerem Nährstoffangebot. Durch FGF15/19 wird die Phosphorylierung von CREB und damit seine Transkriptionsaktivität reduziert, was wiederum als Folge nach sich zieht, dass die sonst hochregulierten Proteine und Enzyme der Glukoseneugewinnung in geringerem Ausmaß exprimiert werden [53].

### 1.1.3.2 Regulation des hepatischen Lipidstoffwechsels

Einer der drei essenziellen Bestandteile für eine ausbalancierte Homöostase eines Organismus stellen, neben Kohlenhydraten und Proteinen, die Lipide/Fette dar. Deren Aufnahme, Verstoffwechslung, Wiederverwertung und viele weitere ihrer Funktionsbereiche konnten bereits detailliert aufgezeigt und belegt werden. Wie in fast allen Stoffwechselbereichen, so auch in dem der Fette und Fettsäuren, nimmt die Leber eine zentrale Rolle ein. Neben der Sammlung und Weiterverteilung, sowie der Synthese und Modifizierung, stellt die präzise Steuerung des Fettsäure-/Fettstoffwechsels eine der Kernkompetenzen dar. Fehlregulationen haben rasch weitreichende Auswirkungen, da z.B. eine pathologisch erhöhte hepatische Fettsäuresynthese zum Mitverursacher eines metabolischen Syndroms werden kann [54, 55].

Welche bemerkenswerten Einflüsse FGF15/19 auf den hepatischen Lipidmetabolismus hat, konnten von Bhathagar et.al. 2009 in ihrer Studie mit Hepatozytenkulturen gezeigt werden.

Hierzu untersuchten sie den Einfluss einer FGF19-Behandlung auf Hepatozyten, von denen vorab die Hälfte mit Insulin behandelt worden war. Insulin, als ein Induktor der Fettsäuresynthese konnte nur in der Abwesenheit des FGF19 sein volles induzierendes Potenzial entfalten, während die Anwesenheit des FGF19 eine Effektminderung von 23% verursachte. Als Ursache hierfür konnten sie zeigen, dass die Insulin gesteuerte Hochregulierung der mRNA-Synthese zahlreicher wichtiger Stoffwechselbausteine wie z.B.: Glukokinase, Acetyl-CoA Carboxylase- $\alpha$  und Fettsäuresynthese, in der Anwesenheit von FGF19 um 38-55% unterdrückt wurde. In Zellen, die keiner Insulinbehandlung unterzogen wurden, konnte keiner dieser Effekte des FGF19 gemessen werden. An Hand weiterführender Testschritte vermuteten Bhatnagar et al., dass der Effekt von FGF19 auf den Fettstoffwechsel über indirekte Beeinflussung regulatorischer Enzyme und Schnittstellen stattfindet. Ihre Beobachtungen zeigen einen plausiblen Mechanismus als Erklärung für die beschriebenen Effekte des FGF19 in HighFat-Diät-Mäusen und deren adipositasassoziierten Erkrankungen [56].

## **1.2 Nukleäre Rezeptoren und ihre Agonisten**

### **1.2.1 Allgemeines**

Um das Überleben eines Organismus zu garantieren, benötigt dieser ein ausgereiftes System zur Kontrolle und Gewährleistung des Energiehaushalts. Eine rasche Anpassung an sich ständig verändernde Bedingungen ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Fehlregulationen in der bedarfsgerechten Versorgung des entsprechenden Organs mit Kohlenhydraten, Fetten oder Eiweißen können zu einer Unter- sowie Überversorgung führen und Mangelzustände wie z.B. Hypoglykämien oder Überfluspathologien wie z.B.: Diabetes mellitus Typ 2 oder Adipositas verursachen. Viele dieser komplexen Kommunikationswege sind immer noch nicht ausreichend und vollständig verstanden, während sich bei anderen bereits weitreichende Erkenntnisse ergaben [57].

Zu Letzteren zählt auch das wachsende Verständnis über die nukleären Rezeptoren (NR). Bei dieser, bis dato 48 Mitglieder zählenden Superfamilie, handelt es sich um ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Umwandlung von extrazellulären Signalen in eine proteinkodierte Zellantwort über genetische Transkription und Translation [58],[59]

Funktionell geschieht dies über die Regulation von spezifischen Zielgenen und hat damit Auswirkungen auf zahlreiche Prozesse wie z.B.: Entwicklung und Stoffwechsel. Unter ihren bereits gut verstandenen Vertretern finden sich die endokrinen Steroidrezeptoren, die der Schilddrüsenhormone und die der fettlöslichen Vitamine A und D [59]. Auf Letztere soll später noch explizierter eingegangen werden.

Generell lassen sich die NRs in zwei Gruppen einteilen. In der Ersten finden sich diejenigen NRs, deren endogener Ligand bereits identifiziert werden konnte. In der Zweiten diejenigen, für die noch kein spezifischer Ligand

nachgewiesen werden konnte. Letztere werden als die sog. Orphan (engl.-Waise) NRs bezeichnet. Durch stetig neue Erkenntnisse über mögliche Liganden dürfte die Zahl der orphan NRs jedoch weiterhin abnehmen. Hinzu kommt, dass nicht endgültig geklärt ist, ob jeder orphan-NR für seine Aktivierung überhaupt auf einen Liganden angewiesen ist oder ob es eventuell auch noch weitere unerkannte Aktivierungsmechanismen gibt [60-62].

Beachtenswert ist außerdem, dass die aktivierten NRs die Gentranskription positive sowie auch negativ bzw. hoch- und herunter regulieren können. Ebenfalls demonstriert werden konnte, dass einige NRs unterschiedliche Einflüsse durch das Vorhandensein oder Fehlen des jeweiligen Liganden besitzen. Cheng et al. konnten dies an Hand des Thyroid-Hormon Rezeptors (TR) zeigen. Ohne seinen Liganden verhindert dieser aktiv die Transkription, aktiviert diese jedoch unter Anwesenheit des Schilddrüsenhormons [63-67].

Der typische NR besteht aus bestimmten funktionellen Komponenten; Einer variablen N-terminalen Region, einer hoch konservierten DNA-bindender Domäne (DBD), einer variablen hinge (engl.- Henkel) Domäne, einer konservierten ligandenbindender Domäne (LBD) und einer variablen C-terminalen Region.

Neben der Einteilung in bekannte und orphan, lässt sich eine weitere Aufteilung der NRs durchführen. Hierbei werden ihre Liganden- und DNA-Bindung sowie ihre Dimerisierungseigenschaften berücksichtigt. Dadurch lassen sich vier Klassen darstellen; die Steroidrezeptoren, die RXR-Heterodimere, Homodimere und monomerische orphan Rezeptoren [58, 68].

Unter den stoffwechselregulierenden NRs, die ihre Einflüsse auf Stoffe wie Fette, Cholesterin, Gallensäure, Glucose uvm. haben, finden sich die peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), die liver X receptors (LXRs) sowie der bereits erwähnte farnesoid X receptor (FXR). Der retinoid X receptor (RXR) dient dabei als der obligater Bindungspartner für die Heterodimerform [65].

In den folgenden Kapiteln soll gezielt auf ein paar wenige, bestimmte NRs und deren bisher bekannten Funktionsweise und Bedeutung eingegangen werden.

## **1.2.2 Vitamin D & Vitamin D Rezeptor/VDR**

Bei der genaueren Betrachtung eines spezifischen Rezeptors muss man unweigerlich auch seinen oder seine bekanntesten Liganden mit in Augenschein nehmen, um einen vollständigeren Eindruck seiner Funktionen zu erhalten.

Schon seit einiger Zeit erweckt Vitamin D das rege Interesse der Wissenschaft. Viele gewonnene Erkenntnisse zeigen das weite Einflussgebiet dieses fettlöslichen Vitamins auf, während weitere Details noch im Verborgenen zu liegen scheinen. Laut Morris stieg die Zahl der bei PubMed aufgenommenen Vitamin D-bezogenen, wissenschaftlichen Arbeiten seit 2009 konstant zwischen 15-20% [69].

Allein schon an der korrekten Bezeichnung, ob nun Vitamin D-Hormon oder Vitamin D, spalteten sich die Gemüter. Der Körper kann zwar selbstständig Vitamin D produzieren, was diesem den Status Hormon verleihen würde, ist dabei allerdings auf die exogene Wirkung von UV-Strahlung angewiesen, was wiederum die Bezeichnung Vitamin rechtfertigen würde.

In einigen seriösen Studien konnte bereits ein definitiver Zusammenhang mit diversen Krankheiten und deren Prävention durch eine adäquate Vitamin D-Zufuhr gezeigt werden. Die validiertesten Korrelationen fanden sich zwischen Rachitis bei Kindern und Osteomalazie bei Erwachsenen und durch Osteoporose bedingte Frakturen und Stürze [69-72].

Durch die offensichtliche große Bedeutung seines Liganden steht natürlicher Weise auch der Vitamin D Rezeptor (VDR) im Fokus der Forschung. Durch die Bindung von  $1\alpha,25\text{-dihydroxy Vitamin D}_3$  ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ ) an den VDR, wird dieser aktiviert und als nukleärer Transkriptionsfaktor tätig [69].

Durch die Chromatin Immuno-Precipitation DNA-Sequenzierung (kurz ChIP-seq) konnte in unterschiedlichen Zellreihen, wie z.B.: den GM10855 oder den

LS180, erstaunliche 1.000 -13.000 VDR-spezifische Genom-Bindungsstellen identifiziert werden [73].

Der Strukturelle Aufbau des VDRs gleicht in vielen Details dem der anderen nukleären Rezeptoren. Das aus 427 Aminosäuren aufgebaute Protein lässt sich gleichermaßen in drei Hauptteile untergliedern; der vergleichsweise kleinen aus 20 Aminosäuren bestehenden sog. A/B-Region, der zentralen DNA-bindenden Domäne mit ihren zwei Zink-Fingern, mit der die Verankerung an den spezifischen Gensegmenten stattfindet und der flexiblen Henkel- Region (sog. D-Domäne). Letztere ermöglicht die Passage des RXR/VDR-Heterodimers in den Nukleus [66].

Betrachtet man die Gene, deren Expression durch den mit  $1\alpha$ ,  $25(\text{OH})_2\text{-D}_3$  aktivierten VDR reguliert werden, zeigt sich ein breitgefächertes und vielseitiges Bild in unterschiedlichen Bereichen des Körpers.

Ein Gebiet, in dem die Einflüsse des aktivierten VDR-Komplexes bereits gut verstanden sind, ist der Mineralhaushalt des Knochens. Um den Auf-, Um-, und Abbau zu regulieren, nimmt  $1\alpha$ ,  $25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -VDR Einfluss auf die Genexpression von z.B.: SPP1 auch als Osteopontin bekannt, BGP, RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), FGF23 und Klotho. Hierdurch wird die Ausbesserung entstandener Schäden gefördert, die Knochenstruktur verbessert und somit eine längere Haltbarkeit des Knochens durch ein reduziertes Frakturrisiko erreicht. Für das dafür benötigte Kalzium wird die intestinale Absorption durch VDR via Induktion von TRPV6 erhöht [74].

Einen weiteren Wirkungsbereich des VDR konnten Schmidt et al. in ihren Tierversuchen mit VDR  $-/-$  Tieren im Vergleich zu Wildtypen zeigen. Auf der hypothetischen Grundlage, dass der Gallensäurehaushalt in den Knock-out-Mäusen fehlreguliert sei, wurde die Menge der vorhandenen Gallensäure und deren Zusammensetzung in den Tieren gemessen. In den sechs Monate alten VDR  $-/-$  Tieren konnte eine Verdopplung der Gallensäuremenge, sowie ein Anstieg der Gallenhydrophobizität, nachgewiesen werden. Wie bereits weiter oben erläutert, spielt CYP7A1 eine entscheidende Rolle im Gallensäurezyklus. In diesem Zusammenhang wurde die Fgf15 Expression in beiden Mausgruppen

gemessen und festgestellt, dass die Wildtypen vier Stunden nach einer VD<sub>3</sub> Behandlung eine höhere intestinale Fgf15-Expression und verminderte hepatische CYP7A1-Spiegel als ihre modifizierten Artgenossen aufwiesen. Eine weitere Schlussfolgerung die daraus gezogen werden konnte, ist die Feststellung das die gemessenen CYP7A1-Unterdrückung durch Vitamin D<sub>3</sub> abhängig von Fgf15 ist, da in Fgf15 -/- Mäusen keine verminderten CYP7A1-Level auftraten [75].

Eines der entscheidendsten Merkmale des VDRs ist allerdings seine Abhängigkeit von RXR und einer obligaten Heterodimer-Bildung beider Rezeptoren. Bindet der VDR seinen Liganden, kommt es zu einer Konformationsänderung, die in einem VDR/RXR-Komplex und der Verlagerung aus dem Zytoplasma in den Nukleus resultiert. An seiner Wirkungsstätte angekommen, bindet der VDR/RXR Komplex an die entsprechenden VDR-Elemente des Genoms [66, 76-78].

Aufgrund der augenscheinlich großen Bedeutung des RXR für die Funktion des VDR und weiteren NRs soll im nächsten Kapitel ein Überblick über diesen erfolgen.

### **1.2.3 Vitamin A & Vitamin A Rezeptoren/ RAR/RXR**

Vitamin A ist ein weiteres fettlösliches Vitamin mit unverzichtbaren Einflüssen auf die unterschiedlichsten biologischen Funktionen und Vorgänge des Körpers von der frühen Embryogenese bis ins Erwachsenenalter. Unter diesen finden sich ganz allgemein der Sehvorgang, Wachstum und Fortpflanzung sowie Entwicklung eines Organismus [79-81].

Egal ob tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, werden alle Vitamin A-Derivate in der intestinalen Mukosa beim Verdauungsvorgang erneut mit langkettigen Fettsäuren verestert und an das lymphatischen System abgegeben. Die Leber dient als Hauptspeicher und Verwerter von Vitamin A [82].

Hinter der zusammenfassenden Bezeichnung Vitamin A, stehen diverse chemische Isoformen und Verbindungen, die sog. Retinoide. Hierbei unterscheidet man zwischen den unterschiedlichen Metaboliten Retinsäure (RA), Retinol und Retinal. Einige der Verbindungen kann der Körper selbst aus Vorgängerstoffen produzieren oder über Enzymatische Prozesse gewinnen. Andere müssen exogen zugeführt werden und gelten damit als essentiell [83]. Das Wirkspektrum der RA reicht von der extranukleären Aktivierung von mitogenaktivierten Protein-Kinasen ohne der Inanspruchnahme eines NRs, über die Aktivierung unterschiedlicher NRs wie z.B.: den peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) bis hin zur namesgebenden Wechselwirkung mit seinen angeblichen Hauptrezeptoren, dem retinoid A receptor (RAR) und dem retinoid X receptor (RXR) [84-86].

Vergleicht man den Retinoid A Rezeptor (RAR) und den Retinoid X Rezeptor (RXR), gibt es einige beachtenswerte Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Beide lassen sich auf jeweils drei Gene zurückführen, die für die unterschiedlichen Subtypen kodieren, RAR/RXR - $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ . Für die einzelnen Subtypen wiederum gibt es mehrere Isoformen die sich in ihrer N-terminalen Region A unterscheiden [86]. In seinem Aufbau zeigt der RAR überraschenderweise eine größere Übereinstimmung mit den Schilddrüsenhormon Rezeptoren als mit dem RXR, was in einer Einteilung in unterschiedliche NR-Gruppen resultiert.

RAR- $\alpha$  lässt sich in den meisten Geweben nachweisen, während sich bei RAR- $\beta$ , - $\gamma$  ein selektiveres Auftreten zeigt. Daraus lässt sich auf unterschiedliche Funktionen schließen.

Der RXR wurde bei seiner Erstbeschreibung ursprünglich als orphan NR kategorisiert [68]. Nach mehreren Dekaden gibt es immer noch viele Unklarheiten über einige seiner Eigenschaften und Liganden. Ohne die Anwesenheit seines RAR-Liganden kann der RXR nicht durch seine spezifischen Agonisten aktiviert werden, während RAR nicht auf eine RXR-Bindung zur Aktivierung angewiesen ist. Allerdings sind eine Vielzahl von NRs wie z.B.: die TRs, VDR, PPARs, FXRs, PXR und einige weitere von der

Heterodimerisierung mit RXR abhängig, da dieser ihre DNA-Bindungseigenschaften verstärkt und sie zusätzlich noch an spezifische Genloci binden lässt [85]. Wenn man sich die große Anzahl der möglichen Heterodimer-Partner und deren wiederum große Anzahl an regulierten Genen vor Auge führt, ergibt sich für den RXR eine immens große Gruppe an beeinflussten Genen.

Mangelsdorf et al. und Mader et al. konnten allerdings zeigen das es auch zur Bildung von RXR-RXR Homodimeren kommt und stellten damit die Frage nach dem Vorhandensein eines unabhängigen Signalwegs des RXRs [85, 87, 88].

Viele der immer noch zu beantwortenden Fragen um den RXR und seine besondere Stellung unter den NR werden die Wissenschaft weiterhin beanspruchen und bei ihrer Beantwortung tiefere Einsichten in die komplexen molekularbiologischen Abläufe und Systeme preisgeben.

### **1.3 Regulation des intestinalen FGF19-Gens durch nukleäre Rezeptoren und deren Agonisten in humane Darmzellen**

Die vielen bereits gewonnenen Erkenntnisse über die zahlreichen Stoffwechselforgänge des menschlichen Körpers, trugen stets zu einem weiteren Verständnis dieser durchaus komplexen Systeme bei. Selbstverständlicherweise ergaben sich durch diese gewonnenen Einsichten umgehend weitere Fragen.

Von ihrer Entdeckung und Erstbeschreibung über ihre Klassifikation bis hin zur Einordnung nach spezifischen Tätigkeitsbereichen, gaben die FGFs bereits bemerkenswerte Einsichten preis. Ihre Einbindung in die eng kontrollierten Stoffwechselbereiche des Gallensäurezyklus sowie des Energiehaushalts eines Organismus stellen dabei nur einen geringen Anteil ihres Aufgabenspektrums dar.

Auch die Familie der bekannten und vielseitigen nukleären Rezeptoren, die als Signalvermittler und -geber fungieren, konnte als unerlässlicher Dreh- und Angelpunkt der intra- und interzellulären Kommunikation identifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Einblicke in die Aktivierung von FGF19 und FXR durch diverse nukleäre Agonisten und deren spezifischer Rezeptoren zu gewinnen. Hierbei soll im humanen Zellmodell versucht und mittels DNA-Analyse untersucht werden, welche messbaren molekularbiologischen Auswirkungen eine Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen in variierenden Konzentrationen bewirkt. Genauer soll betrachtet werden, ob sich Vitamin A und Vitamin D als Induktoren von FGF19 in menschlichen Darmzelllinien eignen, da dies bereits im Mausmodell demonstriert werden konnte.

Dieser initialen Vermutung folgend, sollen auch die möglichen Wechselwirkungen und Synergismen untersucht werden – welche Mechanismen liegen diese zu Grunde und über welche molekularen Signalwege werden diese vermuteten Effekte vermittelt.

Hierdurch soll ein besseres Verständnis für die Rezeptor und Agonisten-abhängigen Abläufe ermöglicht werden, um mögliche Rückschlüsse auf weitere Funktionen bereits bekannter Vertreter zu erlauben.

Aufgrund der bereits oben beschriebenen Tiermodelle und der daraus gewonnenen Einsichten würde sich durch ein noch besseres Verständnis des FGF15/19 und des Farnesoid X Rezeptors in menschlichen Zellen, auf eine zukünftige Anwendung in analytischen und/oder therapeutischen Bereichen hoffen lassen.

Diese Arbeit soll sich deshalb den Fragen widmen, ob eine FGF19 Induktion in humanen Darmzellen durch die nukleären Agonisten VD3, 9-cis RA und CDCA, ähnlich dem Mausmodell, möglich ist und welche Faktoren dabei Einflüsse auf die beschriebenen Effekte haben.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Medien/ Zusätze/ Kits

Tabelle 1 und 2 listen die verwendeten Materialien und Geräte auf, die für sämtliche Arbeitsschritte und Zellkultivierungen verwendet wurden.

Produktname	Hersteller
DMEM High Glucose (4,5 g/l) without L-Glutamin 500ml	G.E. Healthcare, Oskar-Schlemmer-Str.11, 80807 München, Deutschland
Trypsin EDTA (1x) 100ml	
L-Glutamine (200mM) 100ml	
FBS Superior 500ml	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 500ml	Biochrom AG, Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin 100ml	SIGMA life science
Cellstar cell culture flasks 75cm <sup>2</sup> , 250ml	Greiner Bio-one GmbH, Maybachstrasse 2, 72636 Frickenhausen
Cellstar Pipetten 1, 2.5, 5, 10, 25, 50ml	
Lysis Buffer RA1 125ml	RNA-Kit von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6-8, 52355 Dürren
Wash Buffer RAW2 80ml	
Wash Buffer RA3 3x25ml	

Membrane Desalting Buffer MDB 125ml	
Reaction Buffer for rDNase 30ml	
rDNase, RNase free 5 vials	
RNase free H <sup>2</sup> O 125ml	
NucleoSpin® Filters (violet rings) 250	
NucleoSpin® RNA Columns (blue rings) 250	
Collection Tubes (2ml) 750	
Collection Tube (1ml) 250	
<hr/>	
10X RT Buffer, 1.0ml 1 tube	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
10X RT Random Primers, 1.0ml 1 tube	
25X dNTP Mix (100mM) 1 tube (0.2ml)	
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 2 tubes (50U/μl)	Applied Biosystems 6482 Carlsbad, USA
RNase Inhibitor, 2 tubes (100μl)	
FastSYBR Green Mastermix 5ml	
<hr/>	
EtOH absolute. Reag. ISO. 99,8%	Sigma Aldrich, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen. Thermo Scientific, USA
<hr/>	

**Tabelle 1:** Materialien, Zusätze und Kits

## 2.1.2 Geräte

In Tabelle 2 werden sämtliche Geräte aufgelistet, die für die Aufbewahrung, Untersuchung, Analysierung und Weiterverarbeitung der Zellen und Materialien verwendet wurden.

Produktname	Hersteller
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	peQlab Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2b, 91052 Erlangen, Deutschland
Thermo scientific peqSTAR Thermocycler	Applied Biosystems, 6482 Carlsbad, USA
PCR-ViiA7 life technologies CO <sup>2</sup> -Brutschrank	Memmert GmbH + Co KG, 91107 Schwabach, Deutschland
INCO153 med Wasserbad WNB 7-45	
Microbiological Safety Cabinet ClassII Infinity	Esco Technologies, Inc., 2940 Turnpike Drive Hatboro, PA 19040, USA
Stereo Zoom Mikroskop SMZ168	Motic Deutschland GmbH, Spilburgstrasse 1, 35578 Wetzlar, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Hausgeräte Lienz GmbH, Dr.Hans-Liebherrstrasse 1, 9900 Lienz, Austria
Zentrifuge, Mikro200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Föhrenstrasse 12, 78532 Tuttlingen, Deutschland
Gefrierschrank -80°C New Brunswick U725-G	eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5810 R

Safe Lock Tubes,  
1.5ml/ 2.0 ml

Pipetten 0,5µl – 1000µl  
research plus

---

Pipettenspitzen, Biosphere ® Filter Tips	Sarstedt, Rommelsdorferstrasse, 51581 Nümbrecht, Deutschland
---	---

---

Intergra VacuBoy, VacuSafe	Intergra Biosciences AG, 7205 Zizers, Schweiz
-------------------------------	---

---

Neolab-Vortexer	neoLab Migge GmbH, Rischerstr. 7-9, 69123 Heidelberg
-----------------	--

NanoDrop 2000 Programm Thermo scientific	Thermo Fisher Scientific NanoDrop Products, Willmington, Delaware
--	--

---

Accu-jet® Pro	Brand GmbH + Co. Kg, Otto-Schott Str. 25, 97877 Wertheim, Deutschland
---------------	--

---

**Tabelle 2:** Verwendete Geräte

### 2.1.3 Zellreihen und Primer

Die folgenden Zellreihen wurden als Versuchszellen kultiviert

---

Name	Cyrovial-Nr.	Ursprung	Hersteller
Caco-2	300137	Humanes kolorektales Adenokarzinom	CLS – Cell Lines Service GmbH, Justus von Liebig Strasse 14, 69214 Eppelheim, Deutschland
	Vital: 330137		
HT-29	300215		
	Vital: 330215		

---

**Tabelle 3:** Untersuchte Zellreihen

Zur gezielten Untersuchung der Targets hFGF19, hIBABP, hCyp24A1, hCyp26 wurden die Primer in Tabelle 4 verwendet.

Name	Microsynth-Nr.	Forward/ reverse Sequenz
hFGF19_F2	1727264	CAATGTGTACCGATCCGAGAAG/
hFGF19_R2	1727265	GGGCAGGAAATGAGAGAGTGG
hIBABP-F1	1781905	CAGCAGCATGGCTTTCACC
hIBABP-R1	1781906	TTGAAGTTGCGGGCCTTTT
hCyp24A1_F	1747462	CACGTTTGGGAGGATGATGG
hCyp24A1_R	1747463	GCCAGACCTTGGTGTGAGG
hCyp26_F	1747462	TCTTTGGAGGACACGAAACCA
hCyp26_R	1747463	ACTCGTGGGAGAGGGGAGA
hVDR_F2	1727266	GCACTATTCACCTGCCCTTC
hVDR_R2	1727267	AGTGGCGTCGGTTGTCCTT
hFXR-F2	1832268	GGGACAGAACCTGGAAGTGA
hFXR-R2	1832269	AGGCTGCTGGGGGTAGAAAC
hRXR $\alpha$ -F2	1832272	CTTCTCCCACCGCTCCATC
hRXR $\alpha$ -R2	1832273	ATCTGCATGTCCCGCATCTT
hPXR-F	1832274	GCCCAGTGTCAACGCAGAT
hPXR-R	1832275	GTGGCCTTGTCCCCACATAC

**Tabelle 4:** Liste der für die PCR-Untersuchungen verwendeten Primer

## 2.1.4 Kulturmedien

Tabelle 5 zeigt, mit welchen Medien und mit welchen Konzentrationen kultiviert und untersucht wurde.

Zellkultivierung	DMEM High Glucose ohne L-Glutamin 500ml 10% FBS 50 ml 1% Pen/Strep 5ml % NEAA 5ml 1% L-Glutamin 5ml
Versuchskultivierung (1d vor	DMEM High Glucose ohne L-Glutamin

Versuchsmedien)	500ml
	1% Pen/Strep 5ml
	% NEAA 5ml
	1% L-Glutamin 5ml

**Tabelle 5:** Kultur- und Zuchtmedien

### 2.1.4.1 Zellkulturstimulation

Für die Stimulation der Zellen in den Versuchen in Kapitel 3 wurden folgende Substanzen als Induktoren verwendet

Zusatz	Abkürzung	Hersteller
9cis Rentinsäure	9cisRA	Sigma Aldrich, Eschenstrasse 5,
Chenodeoxycholic Acid	CDCA	82024 Taufkirchen. Thermo
Methoprene Acid	MA	Scientific, USA
TTNPB	TTNPB	
1 $\alpha$ , 25-dihydroxy-Vitamin D3	VD3	Enzo Life Sciences

**Tabelle 6:** stimulatorische Zusätze

### 2.1.4.2 Western Blot Materialien

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper waren:

- mouse anti-human FXR/NR1H4 (PP-A9033A-00; R&D Systems; Verdünnung 1:1000)
- rabbit anti-Lamin B1 (PA5-19468; ThermoFisher Scientific; Verdünnung 1:1000)
- goat anti-rabbit IgG, DyLight 650 Conjugate (SA5-10034; ThermoFisher Scientific; Verdünnung 1:2500)
- Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (115-036-062; Jackson Immuno Research; Verdünnung 1:2500)

In Tabelle 7 aufgeführt sind die verwendeten Rezepte für 10% MES/MOPS-Gele: bis-Tris.

In Tabelle 8 werden die verwendeten Puffer aufgeführt. Die entsprechenden Probepufferrezepturen zeigt Tabelle 9.

2x Minigel	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	5%
Acrylamid (30% 37,5:1)	2,66 ml	3,33ml	4ml	1,66ml
4x bis-Tris Gel- Puffer	2,5 ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
10% APS	50µl	50µl	50µl	50µl
H <sup>2</sup> O	4,79ml	4,12ml	3,45ml	5,79ml (4,79 H <sub>2</sub> O+ 1 ml H <sub>2</sub> O Phenolblau)
TEMED	5µl	5µl	5µl	5µl

**Tabelle 7:** Rezepturen der Blot-Gele

10x TBST	4x bis Tris Gel Puffer	5x Laufpuffer:	
Tris/HCl pH 7,8 (100mM)	1,5M bis-Tris (pH 6,5-6,8 - mit HCl einstellen)	250mM	MOPS
NaCl (1,5M)		250mM	Tris
Tween 20 1%		5mM	EDTA
		0,5%	SDS

**Tabelle 8:** Rezepturen der Puffer

Probepuffer: Original 2x Laemmli (mod)			
		Stammlsg.	Add 10ml H <sub>2</sub> O
4%	SDS	20%	2ml
100mM	TCEP	500mM	2ml
20%	Glycerin		2ml
0.004%	Bromphenolblau		0,8 mg
0.125 M	Tris/HCl pH 6,8	1M	1,25 ml

**Tabelle 9:** Rezeptur des Probepuffers

## **2.2 Methoden & Protokolle**

### **2.2.1 Auftauen**

Zum Auftauen der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen wurden die jeweiligen Kryoröhrchen im Wasserbad oder in der Hand erwärmt. Die fast vollständige flüssige Zellsuspension wurde dann sofort in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Komplettmedium überführt.

Die Flüssigkeit wurde bei 1000 G für ca. eine Minute zentrifugiert und der DMSO enthaltende Überstand anschließend rasch entfernt.

Das entstandene Zellpellet wurde mit 15 ml Komplettmedium resuspendiert und in eine ggf. zwei Kulturflasche(n) übertragen.

Die Lagerung der Zellen erfolgte über Nacht im Brutschrank bei  $37,5^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 37% Luftfeuchtigkeit.

Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt um letzte Rückstände des DMSO sowie abgestorbene Zellen zu entfernen. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten wurde ohne Zeitverlust frisches Medium aufgetragen

### **2.2.2 Kultivierung**

Für eine erfolgreiche Kultivierung der Zellen wurde alle zwei bis drei Tage das Medium schonend gewechselt und die Zelldichte mikroskopisch kontrolliert. Ab einem gewissen Dichtegrad des sich gebildeten Zellrasens empfahl sich eine Umsetzung der Zellen in eine neue Flasche mit dann verminderter Zellkonzentration.

Hierfür wurde das Medium behutsam entfernt und die Zellen mit zehn ml PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS wurden drei ml Trypsin gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt. Um möglichst zellschonend zu arbeiten, wurden die Flaschen anschließend im Brutschrank gelagert. Um eine möglichst vollständige Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu gewährleisten, nahm

der Trypsinisierungsvorgang je nach entstandener Zelldichte i.e. 15-20 Min. in Anspruch.

Bei ausreichender Ablösung wurde das vormals klare Trypsin deutlich trüb. Auf diese Zellmischung werden zwölf ml frisches Medium gegeben und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren eine Aufteilung der Zellkluster in einzelne Zellen erreicht.

Um eine anfänglich etwa gleich hohe Anzahl an Zellen zu erreichen, wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Somit konnten die neuen Flaschen mit einer gleichen Anzahl von Zellen angelegt werden.

### **2.2.3 Versuchsabläufe**

**-7 Tage:** Die Zellen wurden sieben Tage vor dem Versuch mit der festgelegten Konzentration von  $c=150.000$  Zellen/ml/well in 24er wellplates ausgesät. Dieser Zeitraum wurde gewählt, um einen möglichst konfluenten und differenzierten Zellrasen zu erhalten.

**-1 Tag:** Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde das Nährmedium durch Neues, ohne üblichen FBS-Zusatz ausgewechselt, um dessen möglichen Einfluss zu minimieren.

**0 Tag:** Am Versuchstag wurden nach der Entfernung der Nährmedien, die zuvor hergestellten Testmedien in den jeweiligen spezifischen Konzentrationen aufgetragen.

**+1 Tag:** nach diversen Zeitpunkten wie z.B.: 18 h oder 24 h, wurden sämtliche Testmedien entfernt, in zwei ml Safe-Lock tubes gesammelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**Zellernte:** Hierzu wird in jedem well ein ml Dulbeccos PBS aufgetragen und mit Hilfe eines Zellschabers der gesamte Zellrasen vorsichtig und gründlich abgetragen. Die Zellsuspension wurden in 1.5 ml Safe-lock tubes gesammelt. Anschließend wurden die tubes für eine Minute bei  $11.000\text{ g}$  zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen, während

das Zellpellet anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

## 2.2.4 RNA-Gewinnung & -Quantifizierung

Die folgenden Schritte halten sich an die Anwendungsanleitung von Macherey & Nagel und wurden für die Versuchsreihen nur geringfügig in einigen Abschnitten modifiziert und abgeändert.

- Vorweg wurde der rDNase-Reaktionsmix, der für den Zellwandverdau benötigt wird, hergestellt und auf Eis gelagert. Hierzu wurden pro Ansatz 90  $\mu\text{l}$  Reaction Buffer für rDNase mit jeweils zehn  $\mu\text{l}$  reconstituted rDNase gemischt.
- Dem Zellpellet wurden 350  $\mu\text{l}$  Buffer RA1 und 40  $\mu\text{l}$  TCEP (100 mM) zugegeben und kräftig gevortext/ vermischt.
- Nachdem sich die Viskosität vermindert hatte, gab man das Lysat auf den NucleoSpin® Filter (violetter Ring) inkl. zwei ml Collection Tube und zentrifugierte mit 11.000 g für eine Min. Der Filter wurde anschließend verworfen.
- Um die RNA-Bindekonditionen anzupassen wurden 350 $\mu\text{l}$  70% EtOH in das Collection Tube gegeben und gründlich vermischt.
- Als nächstes wird das Lysat auf eine NucleoSpin®RNA II Colum (blauer Ring) mit 2ml Collection Tube aufgetragen und bei 11.000 g für ca. 30 Sekunden zentrifugiert.
- Das Collection Tube mit der dann enthaltenen Flüssigkeit konnte entsorgt werden. Der Filter wurde auf ein Neues platziert.
- Zur Entsalzung der Membran wurden 350  $\mu\text{l}$  MDB aufgetragen und erneut bei 11.000 g für eine Minute zentrifugiert. Durch die Entsalzung wurde der nachfolgende DNA-Verdau wesentlich effektiver. Dieser Schritt diente auch dazu die Membran vollständig zu trocknen. Sollte die Membran noch oder

während des Schrittes erneut feucht geworden sein empfahl sich eine Wiederholung der Zentrifugierung.

- Für den DNA-Verdau wurden 95 µl des bereits hergestellten rDNase Reaktionsmix direkt auf die Membran der NucleoSpin® RNA II Colum (blauer Ring) gegeben.
- Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Min.
- Es folgten drei Waschschrte mit zuerst 200 µl Buffer RA2, 600 µl RA3 und 250 µl RA3. Zwischen jedem Schritt erfolgte eine Zentrifugierung bei 11.000 g für 30 Sekunden, nach dem letzten Waschvorgang für 2 Min. Die jeweils abzentrifugierten Flüssigkeiten wurden verworfen.
- Zuletzt wurde der Filter in ein Collection Tube (1.5ml) platziert, die RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser eluiert und für eine Minute bei 11.000 g abzentrifugiert.

Mit Hilfe des Nanodrop 2000 Programms wurde die RNA quantifiziert. Ein µl der Proben wurde auf die Messvorrichtung aufgetragen nachdem diese geeicht wurde. Um einen verwertbaren Mittelwert zu erhalten, wurde dieselbe Probe mindestens zweimal analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse werden zur Erstellung eines geeigneten Pipettierschemas zur cDNA-Herstellung verwendet.

### **2.2.5 cDNA-Synthese/ rtPCR**

Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um Enzyme das zuerst in Viren entdeckt und diesen nachkonstruiert wurde. Mit diesem Enzym gelingt es dem Virus, seine RNA über einen rückwärtslaufenden/ reversen Mechanismus, in DNA umzuschreiben und diese in das Zellgenom der Wirtszelle einzufügen.

Zuerst sollte in den PCR-Tubes die errechnete Menge an RNase freiem Wasser, sowie das jeweilige RNA-Volumen, aus dem erstellten Schema, vorgelegt und gründlich vermischt werden.

Für die eigentliche Reaktion musste ein „Master-Mix“ für alle Reaktionen hergestellt werden, in dem sich je nach Reaktionsanzahl ein bestimmtes

Volumen an 10x RT Buffer, 10x RT Random Primers, 25x dNTP Mix (100 mM), MultiScribe™ Reverse Transcriptase und RNase Inhibitor befand.

<b>Ansatz</b>	<b>1-fach (µl)</b>
10x RT Buffer	2
100mM dNTPs	0,8
10x Random Primers	2
MultiScribe Rtase	0,5
H <sup>2</sup> O	4,2
<b>Total</b>	<b>9,5</b>

**Tabelle 10:** Rezeptur des PCR Master Mix

Für ein Gesamtvolumen von 20 µl wurden 9,5 µl MasterMix und 10,5 µl der Proben-cDNA verwendet.

Die gefüllten PCR-Tubes wurden in die peQStar Thermocycler überführt und das Reverse-Transkriptase-Programm gestartet. Folgende Programmeinstellungen und -Schritte wurden verwendet:

- Aufheizen der Deckplatte bis 110,0°C
- 25°C für 10'0"
- 37,0°C für 2 h0'0"
- 85,0°C für 5'0"
- Herabkühlung auf 4°C, 1,0°C/s
- Lagerung bei 4°C – unbegrenzt

## **2.2.6 Quantitative Real-time PCR**

### **2.2.6.1 Allgemeines:**

Die heute vielfach verwendete PCR beruht auf einem Prinzip, das im Inneren jeder Zelle auf natürliche Art und Weise abläuft. In der Vorbereitung auf eine Zellteilung, wird die im Zellkern enthaltene DNA über Enzymregulierte Schritte dupliziert. Diese biologischen Schritte werden, Dank technischer Unterstützung, in den heutigen PCR-Maschinen exponentiell verstärkt und beschleunigt.

Für eine erfolgreiche Zellteilung bzw. Produktvermehrung müssen die vorhandenen DNA-Doppelstränge zuerst aufgetrennt werden. Diese Auftrennung geschieht in der Zelle in der sog. Initiationsphase durch das Enzym Helicase, nachdem die zuvor bestehenden DNA-Verwindungen durch ein weiteres Enzym, der Topoisomerase entspiralisiert wurden.

Im technischen Bereich wird dieser Schritt durch eine rasche Temperaturerhöhung zeitlich abgekürzt. Bei 95°C wird die Doppelhelixstruktur zerstört und die Stränge trennen sich voneinander zu Einzelsträngen. Außerdem zeichnen sich die verwendeten DNA-Produkte oftmals durch ihre weitaus geringere Länge aus, was den Aufspaltungsprozess deutlich erleichtert und beschleunigt.

Der nächste Schritt gleicht erneut dem biologischen System. An festgelegten Andockstellen binden sog. spezifische Primer. Diese Primer, dienen dem DNA-Polymerase-Komplex als Anfangsstelle für die eigentliche Strang-Reproduktion. Diese Polymerase stellt das verantwortliche Enzym für die Ablesung des kodierenden Stranges und der Synthese des dazu kovalenten Abschnittes. Dieser Schritt wird auch als Annealing (engl. für tempern, ausglühen) bezeichnet. Die technische Amplifizierung bietet den Vorteil, dass die Primer gezielt gewählt und produziert werden können, um das gewünschte oder gesuchte DNA-Segment zu multiplizieren. Hier können erneut durch eine ideale Temperaturanpassung für die sehr hitzestabile DNA-Polymerase von 70-72°C, im künstlichen System wesentlich effektivere Reproduktionsraten erzielt werden. Bei der verwendeten ViiA7 geschieht dieser Prozess nach Herstellerangaben mit bis zu 100 Basenpaaren pro Sekunde.

Während in der Zelle nach Beendigung des letzten Schrittes zwei vollständige Kopien des Ausgangsstranges produziert wurden und die Zellteilung jetzt durch den Eintritt in die M-Phase vervollständigt wird, werden bei der technisierten PCR alle Schritte beliebig oft wiederholt und dadurch eine exponentielle Produktvermehrung erreicht. Die gewünschte Produktzahl folgt  $2^n$  (n = Anzahl der wiederholten Zyklen)

### **2.2.6.2 Quantitative Real-time PCR (rtPCR)**

Als Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR, ermöglicht die quantitative rtPCR die simultane, mengenmäßige Bestimmung und Amplifizierung eines oder mehrerer PCR-Produkte während des Ablaufs eines jeden Zyklus. Durch den fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green® und dessen proportionaler Signalabgabe, lassen sich im direkten Verhältnis die entstehenden DNA-Kopien ermitteln. Binnen einer Stunde liegt ggf. ein verwertbares Ergebnis vor.

### **2.2.6.3 SYBR-Green Funktionsweise**

SYBR® Green ist ein fluoreszierender, DNA-bindender Farbstoff. Er lagert sich in der kleinen Krümmung eines DNA-Doppelstrangs an, wodurch das fluoreszierende Signal im Vergleich zum ungebundenen Zustand, wesentlich und v.a. messbar amplifiziert wird. Steigt nun im Laufe der PCR die Anzahl der DNA-Stränge, so wird exponentiell mehr SYBR® Green gebunden und das Signal dementsprechend verstärkt.

### **2.2.6.4 Nachteile von SYBR® Green**

Ein markanter Nachteil dieser Methode liegt in der Unspezifität des Farbstoffs. Das gesuchte Target aber auch sog. non-sense (engl. für sinnlos) Produkte ohne jeglicher Relevanz, werden gleichermaßen gebunden und senden daraufhin ein messbares und nur schwer zu differenzierendes Signal aus. Die entstehenden Messkurven können somit nicht für konkrete Aussagen herangezogen werden, da sich nicht unterscheiden lässt ob es sich um die gesuchte Targetvermehrung, eine non-sense-Vermehrung oder einer Mischung aus beiden handelt.

### **2.2.6.5 Melting-Curve**

Dieses augenscheinliche Defizit kann allerdings durch eine, dem Amplifizierungsprozess folgende Dissoziation wieder ausgeglichen werden. Hierbei wird das entstandene DNA-Produkt erhitzt und die genaue Temperatur

bestimmt, bei der sich das Produkt auftrennt und zugrunde geht. Am Ende werden die somit ermittelten Daten in einer Meltcurve/ Schmelzkurve dargestellt. Sollte diese Schmelzkurve nur einen einzelnen Anstieg enthalten, kann von einem hohen Reinheitsgrad und Einheitlichkeit der Probe ausgegangen werden. Sollten sich verschiedene kleine Peaks gebildet haben, sollte der Versuch wiederholt und die Parameter geändert werden. Als Grundlage dieses Rückschlusses dient die Überlegung, dass ein und dasselbe DNA-Produkt auch nur eine spezifische Schmelztemperatur aufweist. Sollte sich nun mehrere Peaks gebildet haben, spricht dies für mehrere verschiedene Produkte unterschiedlicher Länge und Beschaffenheit.

#### **2.2.6.6 Ergebnisauswertung und Berechnung;**

Zur Analyse der Experimentdaten bieten sich zwei unterschiedliche Möglichkeiten an;

Die relative standard curve method, deren Vorteil darin liegt das mit einem geringeren Grad an Genauigkeit bereits verwertbar Ergebnisse erbracht werden können. Das gesuchte Target und die verwendete endogene Kontrolle müssen nicht gleichwertig amplifiziert werden.

Eine weitere Methode ist die Comparative CT-Methode ( $\Delta\Delta CT$ ) in der über mathematische Berechnung und Formeln ein Ergebnis kalkuliert werden kann. Diese Methode lässt sich v.a. gut anwenden solange die Effektivität der PCRs von Target und Kontrolle sich relativ gleichen.

#### **2.2.7 Western Blot**

Um mögliche Resultate auch auf Proteinebene darstellen zu können, bot sich das sog. Western Blot Verfahren für unsere Versuche an. Diese Methode ermöglicht allg. über drei Arbeitsschritte eine quantitative Darstellung des jeweiligen „protein of interest“ – dem gesuchten Proteinprodukts.

Folgender allgemeiner Ablauf wurde bei den durchgeführten Versuchen eingehalten;

1. Auftrennung der vorhandenen Proteine im Zelllysat durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
2. Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran – der eigentliche sog. „blot“.
3. Nachweis des gesuchten Proteins mittels spezifischer Antikörper.

### **2.2.7.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Acrylamid bildet hierbei über ein Zweikomponenten Redoxsystem (APS und TEMED) durch die Zugabe von freien Radikalen sog. Polymere aus. Diese entstehen über eine Kettenreaktion und werden in Gegenwart von Bisacrylamid zu Polyacrylamid quervernetzt. Durch eine Veränderung des Verhältnisses von Acryl zu Bisacryl, ermöglicht sich die Herstellung von 8-15% Gelen.

Als nächster Schritt wird das Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Spacer zwischen den Platten sorgen für den erforderlichen Abstand, während die Unterseite mit aufgekochter, 0,5% Agarose-Lösung und einem Gewebeband abgedichtet wird. Die Kammer wird zu Zweidrittel mit dem Trenngel gefüllt. Für eine gleichmäßige Polymerisation wird die Platte am oberen Rand mit Isopropanol überschichtet. Dieses wird nach der Polymerisation des Trenngels wieder entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Als nächstes wird der Kamm behutsam in das noch flüssige Gel gesteckt. Nach der abgeschlossenen Polymerisation erfolgt die Einspannung der Platten in die Gelkammer. Die Kammer selbst wird als nächstes mit Elektrophoresepuffer gefüllt, die Taschen mit Laufpuffer gespült. Als letzter Schritt werden die vorbereiteten Proben (5 Min. bei 95°C in Laemmli-Probenpuffer erhitzt) in die Kammern geladen und die Elektrophorese bei einer Spannung von  $U = 100V$  durchgeführt. Die jeweiligen Rezepte für die verwendeten Gele finden sich unter 2.1.4.2.

### **2.2.7.2 Transfer auf die Nitrocellulose-Membran/ Blotting**

Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran geschieht in einem sog. „Sandwich“-Verfahren. Hierbei werden das Gel auf das die Proteine übertragen wurden und die Nitrocellulosemembran aufeinander gelegt und zu beider Seiten eine erneute elektrische Spannung angelegt. Es muss darauf geachtet werden, dass sich beim Transfer keinerlei Lufteinschlüsse, die die einwandfreie Übertragung verändern könnten, gebildet haben. Der Blot stellte dann die Kathodenseite, das Gel die Anodenseite dar.

Das fertige Sandwich wurde in den Transferständer überführt und mit Eis gekühlt. Der eigentliche Transfer erfolgte dann über Nacht bei einer konstanten Spannung von 10 mA.

### **2.2.7.3 Detektion des Antigens mit spezifischen Antikörpern**

Im Anschluss nach dem Proteintransfer wird die Membran für mindestens 1 Std. bei Raumtemperatur mit 5%-TBST-Milch geblockt. Der jeweilige Primärantikörper wird dann in TBST-Milch verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Diese Inkubation erfolgt unter kontinuierlichem, leichtem Schütteln. Am darauf folgenden Tag erfolgt eine dreifache Waschung der Membran mit TBST für jeweils 15 Min.

Danach wurden die jeweiligen spezifischen Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:5000 für 1 Std. bei Raumtemperatur mit der Nitrocellulose inkubiert. Für den anti-FXR Dianova wird ein Peroxidase-gekoppelter AK, für anti-Lamin B1 ein Fluorophor-gekoppelter AK verwendet.

Nach einem wiederholten dreifachen Waschgang mit TBST für jeweils 15 Min., erfolgt die Detektion der markierten Proteine mittels des ChemiDocMP Imagers von BioRad.

## **3 Ergebnisse**

Noch vor den ersten Versuchen und eigentlichen Testreihen, stand die Etablierung der Zellkultur. Hierbei mussten zuerst die unterschiedlichen Handlungsabläufe bestimmt, sowie geeignete Nähr- und Versuchsmedien gefunden werden. Die unterschiedlichen Faktoren wie z.B.: Brutschrankbedingungen, Brut- und Inkubationszeiten sowie Nähr- und Versuchsmedienzusammensetzungen wurden unter Berücksichtigung des derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnisstandes so angepasst, dass möglichst ideale Bedingungen erzeugt wurden. Hiermit konnte ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen unter reproduzierbaren Verhältnissen gewährleistet werden.

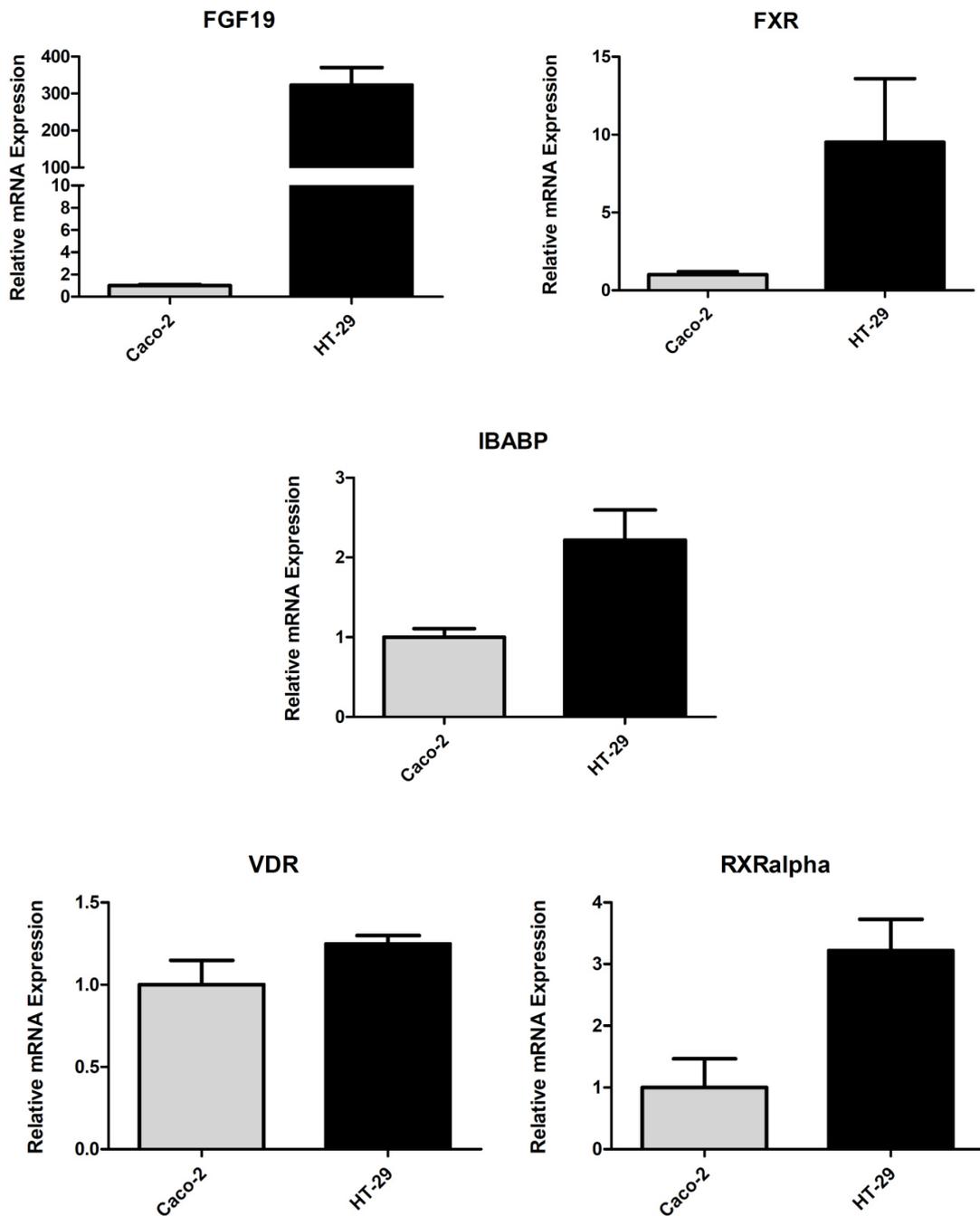
### **3.1 Vergleich der humanen Darmzelllinien Caco-2 und HT-29**

Ziel der ersten Versuche war der Vergleich der beiden humanen Darm-Zelllinien Caco-2 und HT-29 im Hinblick auf die Expression relevanter Gene. Hierbei wurde das basale Expressionsniveau verschiedener nukleärer Rezeptoren (NRs) und ausgewählter Zielgene untersucht.

Dabei wurden die Zellreihen unter „Standard-Bedingungen“ ohne Zusatz von NR Agonisten kultiviert.

Bei allen fünf untersuchten Targets (FGF19, IBABP, FXR, VDR, RXR $\alpha$ ) konnte gezeigt werden, dass in HT-29 Zellen die Expression stets stärker ausgeprägt war, als in den Caco-2 Zellen. Für VDR und IBABP war dieser Unterschied allerdings äußerst gering (1,2- und 2-fach). Bei RXR $\alpha$  konnte eine dreifach höhere Expression gemessen werden. Ein großer Unterschied konnte für FXR gefunden werden, dessen Expression in den HT-29 zehnmal stärker zu messen war. Die eindeutigste Differenz allerdings, fand sich bei FGF19, dessen basale

Expression in HT-29 etwa 300-fach über der der Caco-2 lag. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 1.



**Abbildung 1: Vergleichsreihe Caco-2 und HT-29 und deren Targetexpressionen unter Basalbedingungen.**

HT-29 und Caco-2 Zellen wurden wie im Material und Methodenteil unter Punkt 2.1.4 beschrieben unter Basalbedingungen (ohne Zusätze von NR Agonisten) kultiviert. Die relative basale Expression

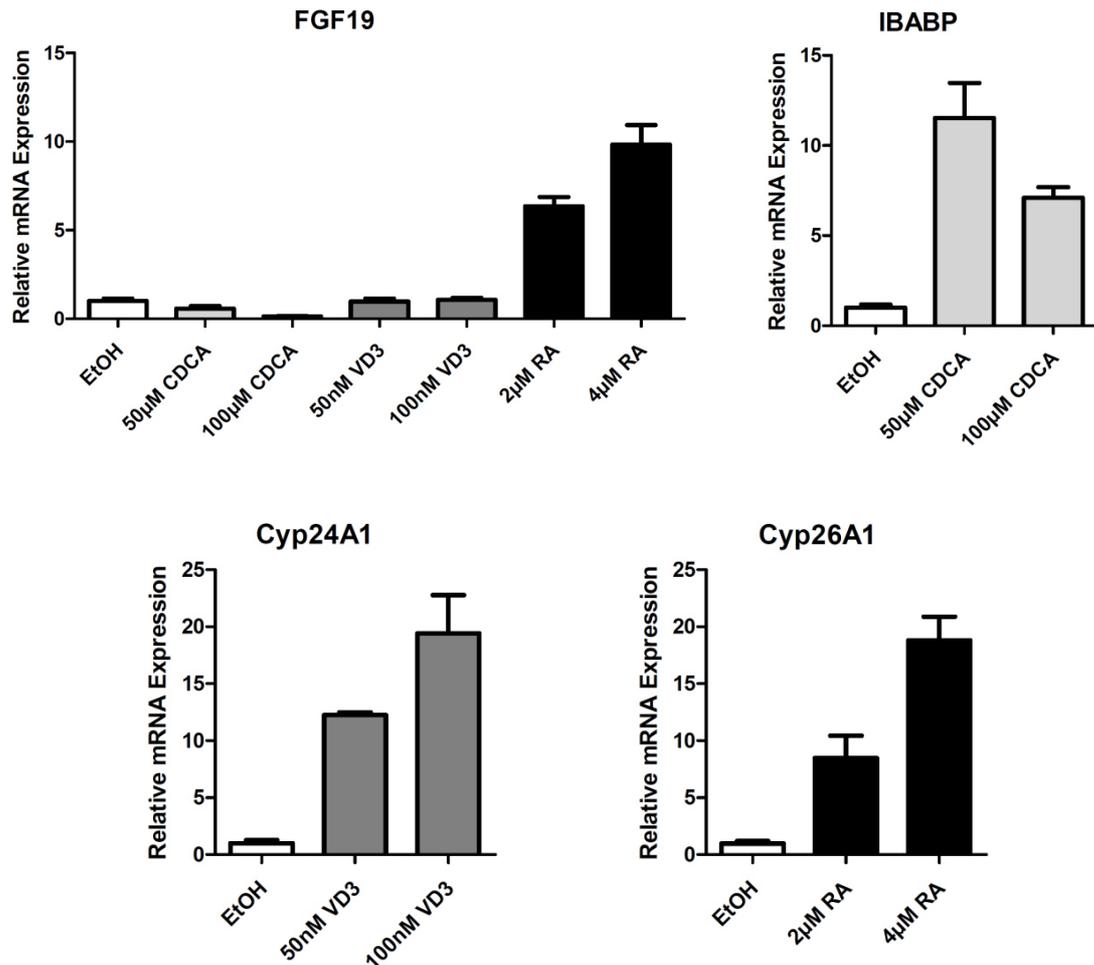
ausgewählter NRs, sowie der beiden FXR-Zielgene FGF19 und IBABP, wurden mittels qPCR analysiert.

## **3.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von CDCA, VD3 und 9-cis RA auf die FGF19-Genexpression in HT-29**

Nachdem HT-29 als die geeignetere Zellreihe identifiziert werden konnte, wurde im nächsten Schritt die konzentrationsabhängige Induktion des FGF19-Gens auf mRNA Ebene durch verschiedene NR-Agonisten untersucht. Als Inkubationsdauer wurde hierbei 18h festgesetzt. Als NR-Agonisten wurden unterschiedliche Dosierungen von CDCA (50  $\mu$ M & 100  $\mu$ M; FXR-Agonist), 9-cis RA (2  $\mu$ M & 4  $\mu$ M; RAR und RXR Agonist) sowie VD3 (50 nM & 100 nM; VDR-Agonist) verwendet. Als Positivkontrollen wurde die induzierende Wirkung der verschiedenen NR-Agonisten auf spezifische, bereits beschriebene Ziel-Gene untersucht. Diese waren IBABP (FXR), CYP24A1 (VDR) und CYP26 (RAR).

Wie in Abbildung 2 gezeigt, wurde die Expression von FGF19 im gewählten 18 h Versuch durch 9-cis RA stark induziert (ca. sechsfach mit 2  $\mu$ M & ca. neunfach mit 4  $\mu$ M). VD3 hatte im untersuchten Zeitfenster hingegen nahezu keinen Effekt (mit 50 nM und 100 nM in etwa vergleichbare Werte zur EtOH Vehikelkontrolle). Nach Inkubation mit dem FXR-Agonisten CDCA war die Expression von FGF19 sogar deutlich gegenüber dem Kontrollniveau (EtOH) reduziert.

Die mRNA Expression aller untersuchten Kontroll-Gene (IBABP, CYP24A1 und CYP26A1) wurde durch die korrespondierenden NR-Agonisten in der erwarteten Weise stark induziert.



**Abbildung 2: Konzentrationsabhängiger Einfluss von NR-Agonisten auf die FGF19-Expression in HT-29 Zellen;**

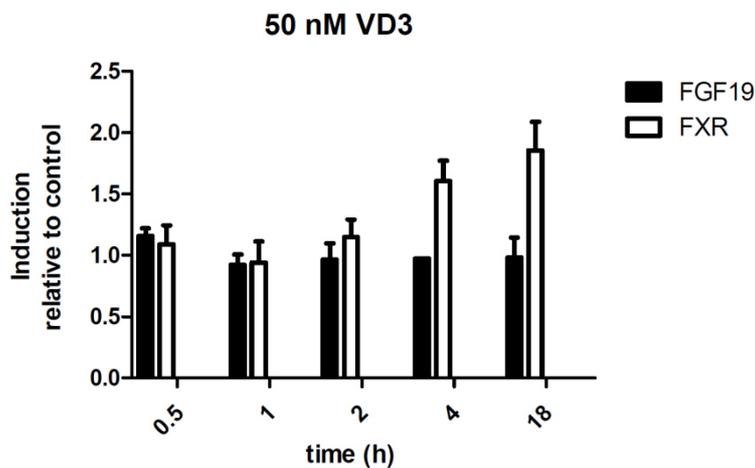
HT-29 Zellen wurden mit den NR-Agonisten Chenodeoxycholic Acid (CDCA), 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) und 9-cis RA in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die dadurch induzierte Expressionssteigerungen auf FGF19 und der Kontrollgene IBABP, Cyp24A1 und Cyp26A1 wurden mittels der qPCR, wie unter 2.2.6 beschrieben, ermittelt.

### 3.3 Zeitabhängige Induktion von FGF19

#### 3.3.1 1,25 (OH) Vitamin D<sub>3</sub>

Da sich, wie in Abb.2 erkennbar ist, mit Vitamin D keinerlei Expressionssteigerung des FGF19 erzielen ließ, wurde in einem weiteren Schritt der mögliche Einfluss des Faktors Zeit untersucht. Wie in den vorhergegangenen Versuchen wurden die Zellen gleichermaßen kultiviert, mit 50 nM VD<sub>3</sub>

behandelt und zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten (0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 18 h) zur Auswertung geerntet. Neben FGF19 wurde ebenfalls die Expression von FXR untersucht. Als Positivkontrolle wurde CYP24A1 untersucht. Wie zu erwarten konnte hierbei ein starker Anstieg der CYP24A1 Expression nach der VD3-Stimulation gemessen werden (ca. 820-fach nach 4 h; nicht gezeigt). Wie der Graph in Abb. 3 zeigt, wurde zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Anstieg der FGF19 Expression verzeichnet. Für FXR währenddessen, konnte nach einem geringen Abfall nach 1 h, ein leichter, kontinuierlicher Anstieg gemessen werden, der bei 18 h in einer mehr als eineinhalbfachen Steigerung sein Maximum erreichte.



**Abbildung 3: Zeitreihenversuch mit 50nM 1,25 (OH)2 Vitamin D3;**

Bei einer gleichbleibenden Konzentration von 50 nM 1,25 (OH)2 Vitamin D3 wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten die Expressionen von FGF19 und FXR ermittelt. Den sich nicht verändernden Werten für FGF19, stehen die ansteigenden Werte der FXR-Expression gegenüber.

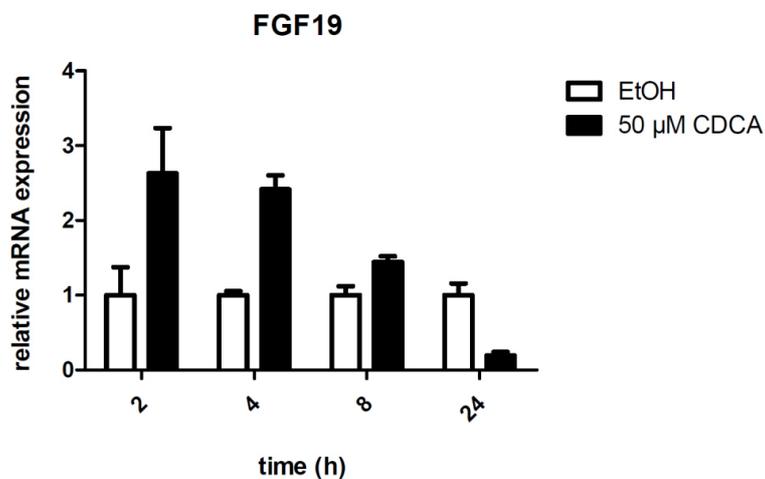
### 3.3.2 9-cis RA und CDCA als separate Induktoren

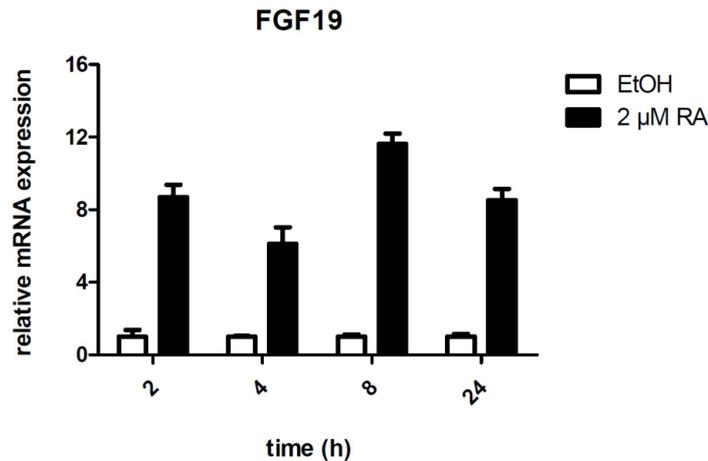
In einem analogen Versuchsaufbau, mit unterschiedlichen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 8 h, 24 h), wurden anschließend die zeitabhängigen Effekte von 50 µM CDCA und 2 µM 9-cis RA auf die Expression von FGF19 analysiert. Wie bereits zuvor diente EtOH als Vehikelkontrolle. Wie im ersten Graph der Abb.4 ersichtlich ist, zeigte sich für CDCA eine starke zeitliche Abhängigkeit in der Expression von FGF19. Im Vergleich zum ersten Zeitpunkt (2 h) und einer ca.zwei- bis

dreifachen Steigerung, lässt sich der stetige Rückgang der Expression beobachten, bis diese nach 24 h sogar weit unter das Kontrollniveau des EtOH zurückging.

Die Expressionssteigerung von FGF19 durch 2  $\mu$ M 9-cis RA war deutlich stärker, als die des CDCA, mit einem Maximum zum Zeitpunkt 8 h und einer zwölffachen Steigerung. Aus Graph 2 wird außerdem ersichtlich, dass der Effekt von 9-cis RA auf die FGF19 Expression im Vergleich zu CDCA deutlich länger anhielt und weniger stark zeitabhängig erschien. Während der Einfluss des CDCA auf die FGF19-Expression zunehmend nachlässt, konnte für den zeitlichen Verlauf des 9-cis RA keine eindeutige Richtungstendenz ermittelt werden.

Als Resultat der gezeigten Versuche, konnte somit ein bisher nicht beschriebener Effekt des 9-cis RA gezeigt werden. Der RAR und RXR-Agonist 9-cis RA induziert eine starke Expression des intestinalen FGF19-Gens in humanen Zellen mit einem Maximum bei 8 h.





**Abbildung 4: FGF19 Induktion durch die beiden NR-Agonisten CDCA und 9-cis RA;**

Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 4, 8 und 24 Std.) wurde mit gleichbleibenden Konzentrationen von 50 μM CDCA und 2 μM 9-cis RA die Expression von FGF19 ermittelt und verglichen. Die starke zeitliche Abhängigkeit des CDCA-Effekts und deren eindeutig negativer Verlauf, unterschied sich signifikant vom fluktuierenden Verlauf des 9-cis RA Effekts. Zu jedem Zeitpunkt war der Einfluss des NR-Agonisten 9-cis RA mindestens doppelt so stark wie der der CDCA.

### 3.3.3 Synergismus von RA und CDCA

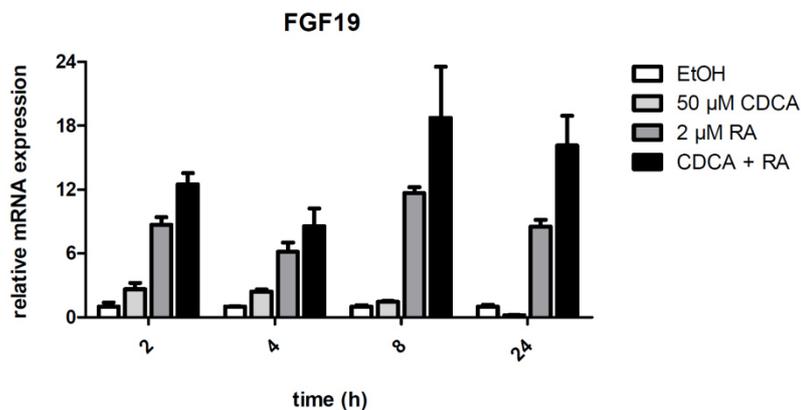
Die nächste weiterführende Überlegung bestand nun in einer Kombination beider Substanzen (Chenodeoxycholic Acid - CDCA und 9-cis RA), um mögliche Wechselwirkungen beobachten zu können. Hierzu wurde zusätzlich eine Mischung aus 50 μM CDCA und 2 μM 9-cis RA auf HT-29 Zellen (mit den gleichen Ausgangsbedingungen wie in den getrennten Versuchen) aufgetragen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll von hier an diese Mischung als CDCA/RA-Mix bezeichnet werden.

Für den Zeitpunkt von 2 h konnte ein fast additiver Effekt beobachtet werden (zwei-dreifach bei 50 μM CDCA, achtfach bei 2 μM 9-cis RA und zwölfmal mit dem CDCA/RA-Mix). Wie in den oben gezeigten Versuchen, verringerte sich der Effekt beider einzelnen Induktoren, sowie deren Mischung nach 4 h. Von einer Effektaddition kann allerdings auch hier noch ausgegangen werden (zweifach bei 50 μM CDCA, sechsfach bei 2 μM 9-cis RA und achtfach durch CDCA/RA-Mix).

Obwohl der Einzeleffekt von CDCA auf die FGF19 Expression, wie im Graph gezeigt, bei 8 h stark nachließ und nach 24 h bereits deutlich negativ war, zeigt sich eine mehr als additive Wirkung des CDCA/RA-Mix zu diesen beiden späteren Zeitpunkten: Nach 8 h erreichte diese ihr Maximum einer ca. 18-fach gesteigerten Expression des FGF19 (1,5fach bei 50  $\mu$ M CDCA, zwölfmal bei 2  $\mu$ M 9-cis RA und 18-fach bei CDCA/RA-Mix).

Auch nach 24 h stellte die Mischung den effektivsten Induktor einer FGF19 Expression. Verglichen mit der alleinigen RA-Wirkung, lässt sich für die Kombination aus 50  $\mu$ M CDCA und 2  $\mu$ M 9-cis RA eine Verdopplung der Expression beobachten (annähernd Null bei 50  $\mu$ M CDCA, achtfach bei 2  $\mu$ M 9-cis RA und 16-fach bei der Mischung).

Zusammenfassend lässt sich aus den gezeigten Daten schlussfolgern, dass CDCA und 9-cis RA im gewählten Versuchsansatz zu späteren Zeitpunkten (8 und 24 h) einen stark synergistischen Effekt auf die FGF19 Genexpression ausüben.



**Abbildung 5: Verlauf der Expressionssteigerung von FGF19 durch eine CDCA/RA-Mischung;** zeitlich (2, 4, 8, 24 Std.) variierender Verlauf der Expression im Vergleich zu den NR-Agonisten einzeln.

### 3.4 Ursachen des Synergismus

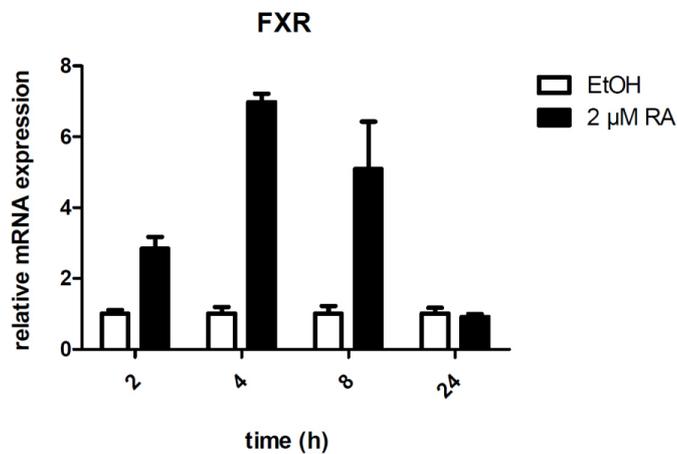
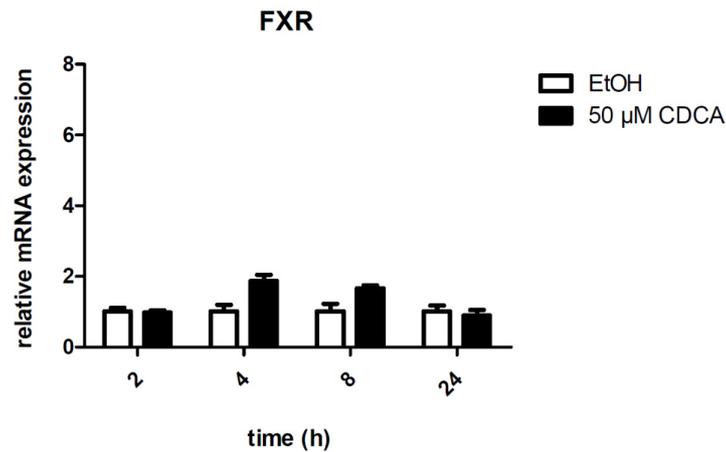
Im vorangegangenen Abschnitt wurde ein starker Synergismus der beiden NR-Agonisten CDCA (FXR Agonist) und 9-cis RA (RAR und RXR Agonist) auf die Genexpression von FGF19 beschrieben. Im nächsten Schritt sollte daher, der diesem Synergismus zugrundeliegende Mechanismus, auf molekularer Ebene weiter untersucht werden.

Als Arbeitshypothese wurde dabei folgendes angenommen;

9-cis RA könnte die Expression des FXR hochregulieren. Dies könnte wiederum als Resultat nach sich ziehen, dass die durch FXR vermittelte Induktion der FGF19 Transkription, bei gleichzeitigen Vorhandensein beider NR-Agonisten CDCA und 9-cis RA, verstärkt wird und länger andauert.

Um diesbezüglich weiteres Verständnis für den gefundenen Synergismus aus 3.3 zu erhalten, wurde im nächsten Versuch die Wirkung von CDCA und 9-cis RA (und ihrer Mischung) auf die mRNA Expression von FXR untersucht. Die vier Zeitpunkte (2 h, 4 h, 8 h, 24 h) wurden beibehalten, ebenso wie die Dosierungen von Chenodeoxycholic Säure (50  $\mu$ M) und 9-cis RA (2  $\mu$ M). Abb. 6 zeigt zuerst die Wirkung der 50  $\mu$ M CDCA (links), danach die Wirkung der 2  $\mu$ M RA (rechts). Im Vergleich zur EtOH-Kontrolle konnte für CDCA eine Verdopplung der Expression bei 4 h und 8 h festgestellt werden. Zu den anderen Zeitpunkten ergab sich keine nennenswerte Induktion.

Mit 2  $\mu$ M RA dagegen konnten wesentlich deutlichere Resultate erzielt werden. Ein Maximum der FXR-Expression zeigte sich hierbei nach 4 h mit einer ca. siebenfachen Steigerung. Beim Zeitpunkt 8 h war bereits ein Rückgang zu erkennen, allerdings lag die FXR Expression hier immer noch bei ca. fünffach über dem Ausgangswert. Bei 24 h glich das Expressionslevel erneut dem der EtOH-Kontrolle.



**Abbildung 6: Wirkung der NR-Agonisten CDCA und 9-cis RA auf die FXR-Expression;**

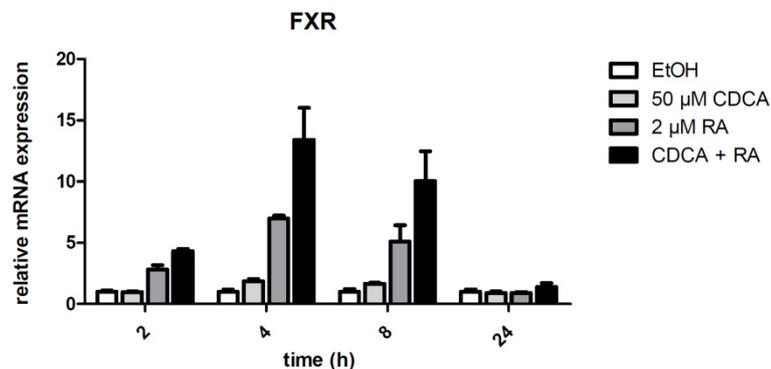
mit gleichbleibenden Konzentrationen von 50 µM CDCA und 2 µM RA wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 4, 8, 24 Std.) die Expressionssteigerung durch die NR-Agonisten gemessen. Bei CDCA zeigt sich nur ein geringfügiger Unterschied zur EtOH-Vehikelkontrolle, während sich bei RA eine zeitweise starke Induktion in der qPCR nachweisen ließ.

Beim Vergleich der Expressionssteigerung der separaten Substanzen mit ihrer Mischung (CDCA + RA) wurden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten bemerkenswerte Ergebnisse gefunden. Während sich zum Zeitpunkt 2 h aus einer Addition der einzelnen Ergebnisse die Expressionssteigerung der Mischung ergab und dieses auch teilweise für den Zeitpunkt 8 h zutreffend war, verdoppelte sich die Expression von FXR nach 4 h auf das 14-fache durch den CDCA/RA-Mix verglichen mit deren einzelnen Steigerungen. (RA ca. sieben-

fach, CDCA ca. zweifach), so dass ein synergistischer Effekt von CDCA und RA auch auf die Induktion der Transkription des FXR-Gens vorzuliegen schien.

Zum Zeitpunkt 24 h dagegen wurde – wie für die einzelnen Substanzen bereits diskutiert – auch für die Kombination aus CDCA und RA keine verstärkte Expression der FXR mRNA im Vergleich zur Vehikelkontrolle (EtOH) gefunden.

Insgesamt stehen die gezeigten Daten zur Induktion des FXR auf mRNA Ebene im Einklang mit der Hypothese, dass die molekulare Grundlage des unter 3.3.3 beschriebenen Synergismus von CDCA und RA zumindest teilweise auf die Hochregulation von FXR durch 9-cis RA zurückzuführen sein könnte.



**Abbildung 7: Vergleichsreihe der FXR-Expressionssteigerung durch drei unterschiedliche Zusätze und deren zeitlicher Verlauf;**

Zu den Zeitpunkte 2, 4, 8 h zeigte sich eine mehr als additive Induktion des FXR-Gens durch den CDCA/RA-Mix im Vergleich zu beiden einzelnen NR-Agonisten. Einzig bei 24 h ließ sich keinerlei nennenswerter Unterschied in allen drei Testreihen feststellen.

### 3.5 Studien zur Genexpression

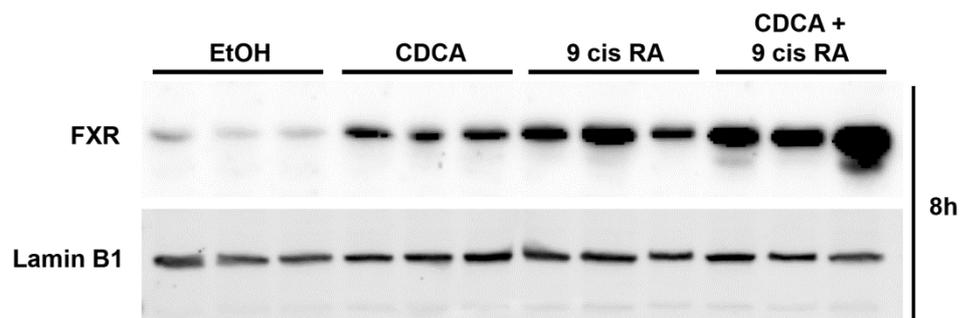
Der vorangegangene Abschnitt beschreibt die Regulation der FXR Expression auf mRNA Ebene durch 9-cis RA. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch eine entsprechende Veränderung der FXR Proteinmenge bewirkt, wurden Western Blots durchgeführt. Dabei wurde die Expression des FXR Proteins nach Inkubation von HT-29 Zellen mit CDCA, 9-cis RA und CDCA/RA-Mix zu

unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (8 h und 24 h). Bei den Interpretationen der Western Blots handelt es sich um eine semi-quantitative Bewertung, bei der Lamin B1 als Ladekontrolle verwendet wurde.

Zum 8 h Zeitpunkt wurde hierbei eine erhöhte Dichte des FXR Proteins in allen Inkubationsbedingungen festgestellt. Im Einklang mit den oben gezeigten mRNA Daten erhöhte die Inkubation mit CDCA den Anteil des FXR Proteins moderat, während der RAR/RXR Agonist 9-cis RA einen etwas stärkeren Effekt hatte.

Die deutlichste Erhöhung der FXR Proteinmenge wurde nach gleichzeitiger Inkubation mit beiden Substanzen festgestellt. Die beschriebenen Effekte konnten in ähnlicher – quantitativ jedoch weniger stark ausgeprägter – Form ebenfalls nach 24 h beobachtet werden. Dies ist vor dem Hintergrund, dass mRNA-spezifische Effekte bereits nach 24 h nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 7) zu erwarten. Der länger andauernde Effekt auf Proteinebene lässt vermuten, dass das FXR Protein eine längere Halbwertszeit aufweist als seine mRNA.

Insgesamt bestätigen die durchgeführten Western Blots die auf mRNA gefundenen Daten und zeigen, dass 9-cis RA in der Lage ist, die Abundanz von FXR deutlich zu erhöhen.



**Abbildung 8: Expression des FXR Proteins nach 8 h.**

HT-29 Zellen wurden wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben mit CDCA, 9-cis RA oder CDCA + 9-cis RA inkubiert. Die Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert und äquivalente Mengen der Zelllysate wurden mittels Western blot auf die Expression des FXR Proteins hin analysiert. Als Ladekontrolle wurde Lamin B1 verwendet.

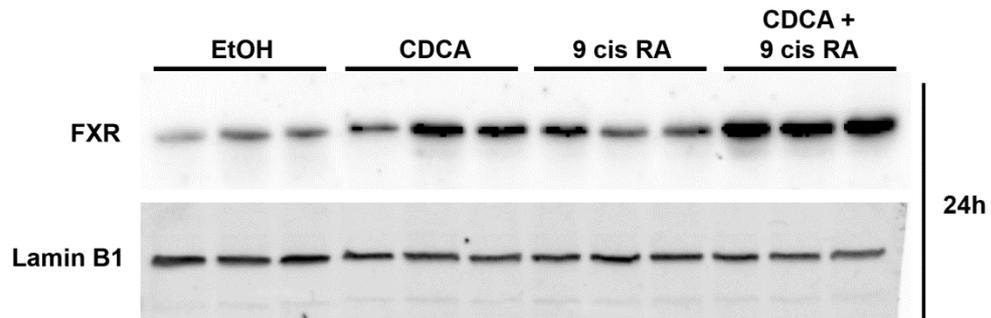


Abbildung 9: Expression des FXR-Proteins nach 24 h Inkubation mit NR-Agonisten

### 3.6 Spezifische RXR/RAR-Agonisten

Aus den vorhergegangenen Versuchen in den Kapiteln 3.2 – 3.5 wurde wiederholt ersichtlich, dass 9-cis RA in den untersuchten HT-29 Zellen, eine unumstrittene Wirkung auf die FXR- und FGF19-Expression hat. Dieser Effekt scheint seinen Höhepunkt im Zeitraum zwischen 4 – 24 Stunden zu haben.

Eine noch stärkere Expression konnte nur durch eine Kombination aus CDCA und 9-cis RA erreicht werden, wie unter Kapitel 3.3.3 und Folgenden ebenfalls belegt wurde. Um einige der möglichen Ursachen dieses Synergismus zu erklären, vor allem in Anbetracht der eher geringen alleinigen Wirkung des CDCA auf die HT-29 Zellen, wurden in den folgenden Versuchen die zwei nukleären Rezeptoren des 9-cis RA, RXR und RAR isoliert untersucht. Unsere Ausgangsvermutung war, dass sich bei einer separaten Betrachtung eine mögliche Erklärung für den CDCA/RA Synergismus ergeben könnte. Weitergehend sollten ebenfalls Einblicke in die Gründe der Expressionssteigerung durch 9-cis RA gewonnen werden.

Um die getrennte Betrachtung von RXR und RAR zu ermöglichen, wurden spezifische Agonisten der jeweiligen Rezeptoren verwendet und deren Wirkung auf die FGF19, sowie die FXR-Expression analysiert. Als gezielter RXR-Aktivator wurde Methoprene Acid (MA) in den Konzentrationen 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M

und 40  $\mu\text{M}$  herangezogen, während TTNPB in den Konzentrationen 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  zur isolierten RAR-Aktivierung genutzt wurde. Neben den beiden spezialisierten NR-Agonisten wurde wie in allen anderen Versuchen EtOH als Vehikelkontrolle genutzt. Um zusätzlich neben den Einzelaktivierungen einen Vergleich zur Simultanaktivierung zu erhalten, wurden die Zellen ebenfalls erneut mit 9-cis RA behandelt.

Mit den bereits bewährten Methoden wurden die Zellen kultiviert, behandelt und nach 8 Stunden geerntet.

### **3.6.1 Die Rolle des RAR in der FGF19-Aktivierung**

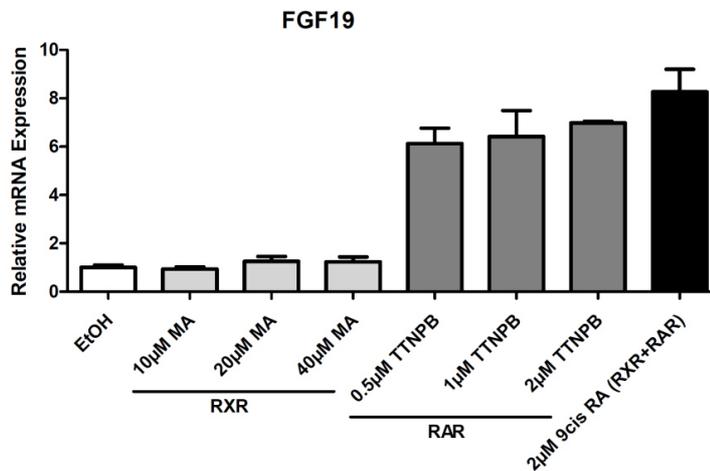
Bei der Betrachtung der FGF19-Expression konnte nachgewiesen werden, dass die Wirkung der 9-cis RA zum größten Anteil auf der Aktivierung des RARs beruht. Diese Erkenntnis ergab sich aus folgenden Ergebnissen;

Mit der verwendeten Höchstkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  TTNPB konnte eine ca. siebenfache Expressionssteigerung erzielt werden. Auffällig war hierbei allerdings der geringe Unterschied zu den anderen beiden Konzentrationen, da diese ebenfalls annähernd an den Steigerungseffekt der 2 $\mu\text{M}$  heran kamen. (0.5  $\mu\text{M}$  mit ca. sechsfach, 1  $\mu\text{M}$  mit ca. 6,5-fach). Ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang lässt sich aus den ermittelten Resultaten allerdings nicht erschließen.

Für die verwendete MA konnte fast kein Unterschied zur EtOH-Vehikelkontrolle festgestellt werden. Die drei verwendeten Konzentrationen zeigten nur marginale Unterschiede zueinander (10  $\mu\text{M}$  ca. einfach, 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  ca. 1,2-fach). Als mögliches Resultat daraus, lässt sich schlussfolgern, dass der RXR keinerlei nennenswerten Anteil in der FGF19 Expression zu haben scheint.

Die 9-cis RA diene in diesem Versuchssetting als Kontrolle. Wie zu vermuten, konnte durch diese ebenfalls eine Steigerung der Expression des FGF19 nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache hierfür könnte eine Koaktivierung beider Rezeptoren oder weitere, noch unverstandene Mechanismen vermutet

werden. Die scheinbare Tatsache, dass sich das durch 9-cis RA erzielte Ergebnis aus einer Addition der beiden separaten Rezeptoraktivatoren ergibt, scheint wohl eher dem Zufall geschuldet.



**Abbildung 10: Gezielte Expressionssteigerung von FGF19 durch TTNPB:**

Die Graphen zeigen eine starke Expressionssteigerung des FGF19 durch die gezielte Aktivierung des RAR. Diese wird nur durch eine simultane Aktivierung beider Rezeptoren RAR und RXR durch die 9-cis RA übertroffen.

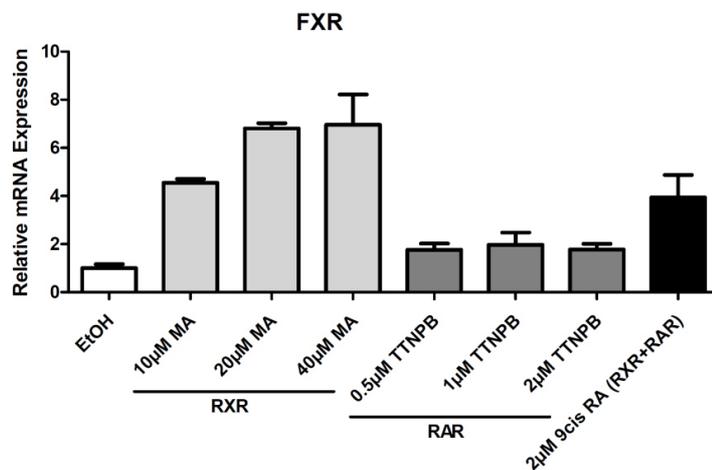
### 3.6.2 Die Rolle des RXR in der FXR-Aktivierung

Da im vorhergehenden Versuch der Einfluss auf die FGF19-Expression untersucht wurde, sollte in diesem nun das Augenmerk auf die des FXR gerichtet werden. Dabei zeigte sich ein umgekehrtes Bild bei der Regulation von FXR mRNA durch die drei gleichen Aktivatoren MA, TTNPB und 9-cis RA. Hierbei wurde deutlich, dass der spezifische RXR-Antagonist Methoprensäure eine starke Induktion der FXR-Expression vermag. Mit den Konzentrationen 20 µM und 40 µM wurde eine ca. 6,5-fache Steigerung erreicht, mit 10 µM MA eine immerhin noch ca. fünffache. Eine Aussage zur Konzentrationsabhängigkeit lässt sich hieraus allerdings nicht ziehen. Die Bedeutung des RXR für die FGF19-Expression konnte hierdurch allerdings belegt werden.

Ein entscheidender Effekt des RAR, der durch die bereits im oben stehenden Versuch verwendeten TTNPB-Konzentrationen aktiviert wurde, konnte nicht

festgestellt werden. Mit vergleichbar geringen Steigerungen von ca. 1,2-fach als Mittelwert, musste davon ausgegangen werden, dass der RAR, entgegen dem RXR, nur einen äußerst geringen Einfluss auf die FXR-Expression aufweist.

Erstaunlicher Weise konnte durch die erneut verwendete 9-cis RA kein vergleichbares Steigerungslevel wie unter 3.6.1 erzielt werden. Mit einer ca. vierfachen Expressionssteigerung bei FXR ist diese ca. halb so stark wie die der FGF19-Expression. Wie Abb. 11 zeigt, liegt das durch 9-cis RA erzielte Resultat zwischen den der beiden separaten Aktivatoren MA und TTNPB.



**Abbildung 11: Anteil des RXR an der Expressionssteigerung des FXR**

Im gezeigten Versuch wird der Unterschied der RXR-Aktivierung (mittels MA) im Vergleich zur Aktivierung RAR (mittels MA) ersichtlich. 9-cis RA (aktiviert RAR und RXR) wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt, da aus den vorherigen Versuchen bekannt war, dass 9-cis RA die Expression des FXR induziert (vgl. Abb. 6).

### 3.7 Ergebnissesynopsis

FGF19 und FXR lassen sich in den humanen Kolonadenomzellen HT-29, durch die gezielte Aktivierung von RXR und RAR mit bestimmten Konzentrationen an 9-cis RA, in ihrer Expressionsrate steigern und induzieren. Über diverse durchgeführte Versuche konnten wir eine zeitliche Abhängigkeit erkennen, die sich

auf einem DNA-Level anhand der vollführten PCRs, sowie auf einem Protein-level ermittelt durch die Western Blots, zeigte. Vitamin D zeigte unter den verwendeten Versuchsbedingungen die geringsten Effekte auf die Expression und Induktion von FGF19 und FXR.

Durch eine getrennte Betrachtung der beiden Vitamin A-Rezeptoren RXR und RAR, konnten wir demonstrieren, dass es durch die gezielte Aktivierung des RAR zu einer gesteigerten FGF19-Expression kam, während die spezifische Aktivierung des RXR zu einer erhöhten FXR Induktion führte.

Unsere Versuche zeigen, dass eine besonders deutliche Expressionssteigerung von FGF19 durch die Verwendung eines Gemisches aus CDCA und 9-cis RA erreicht werden kann.

## 4 Diskussion

Um die in Mäusezellen bereits beschriebenen Effekte der nukleären Agonisten VD3, 9-cis RA und CDCA auf die Expressionen von FGF19 und FXR möglicherweise auch in humanen Zellen nachweisen zu können, stand als erster Schritt die Suche nach einem geeigneten Zellmodell.

### 4.1 Selektion der Versuchszellen

Der initiale Vergleich der beiden Zelllinien Caco-2 und HT-29 diente zur Festlegung auf das geeignetere biologische Versuchsmodell. Gemeinsamer Ursprung beider Zelllinien sind humane, epitheliale Kolonadenome. Die Vorauswahl wurde aus zweierlei Gründen getroffen. Zum einem finden sich für beide Zelllinien bereits zahlreiche Belege für ihre Versuchstauglichkeit, zum anderen konnten einige Studien einen Anstieg an VD-Rezeptor in tumorigenen Kolonzellen nachweisen. Letzteres war v.a. in Anbetracht eines vermuteten VD-Effekts von gesteigertem Interesse [89, 90].

Unter unveränderten, neutralen Nährmedienbedingungen zeigte HT-29 für die untersuchten Genen stets höhere Expressionsraten als Caco-2. Das Hauptaugenmerk lag auf der FGF19- und FXR-Expression, die sich in den HT-29 signifikant höher darstellte. Ebenfalls von Interesse waren die Expressionen von VDR, RXR $\alpha$  und IBABP. Für RXR $\alpha$  und IBABP zeigten sich zwar geringere, aber noch immer demonstrierbare Unterschiede. Bei der VDR-Expression zeigte sich fast kein Unterschied zwischen beiden Zelllinien.

Durch diese gewonnenen Erkenntnisse konnte gezeigt werden, dass sich die HT-29 Zellen für die nachfolgenden Expressionsnachweise als geeigneter erwiesen.

## 4.2 Versuche und Beobachtungen

### 4.2.1 Vitamin D Effekte und Folgerungen

Ein wichtiger Ansatz in unseren Versuchen, war der Vergleich der bekannten Ergebnisse von Schmidt et al. Nagerstudien, zu den von uns neu erbrachten Resultaten mit humanen Zellen. Hierdurch erhofften wir uns, die möglichen Unterschiede sowie eventuelle Gemeinsamkeiten besser darlegen zu können und somit tiefere Einblicke in die zugrunde liegenden Abläufe zu erhalten.

In ihren Versuchen benutzten Schmidt et al. diverse unterschiedliche Knock-Out Mäuse und verglichen deren Testresultate mit denen nicht modifizierter Wildtypen. VD-Rezeptor Knock-out Mäuse (VDR -/-) zeigten beispielsweise einen verminderte basale Fgf15-Expression, was wiederum zu dem Rückschluss führte, dass VDR scheinbar Fgf15 auf einem transkriptionellen Niveau kontrollieren könnte. Diese Vermutung wurde dann bestätigt, da die Fgf15 Expression in Wildtypen, nicht aber die der VDR-/- Mäuse, vier Stunden nach Behandlung mit  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> deutlich anstieg. Gleichzeitig wurden die intestinalen Gallensäuretransporter, sowie die Expression des regulativen Cyp7a1 vermindert. Beweisend für den Zusammenhang zwischen VD<sub>3</sub>, Cyp7a1 und Fgf15 war ein weiterführender Versuch mit Fgf15 -/- Mäusen in denen die oben beschriebene Unterdrückung des Cytochroms Cyp7a1 durch VD<sub>3</sub> fehlte. Es gelang Schmidt et al. mit ChIP-Analysen zu zeigen, dass die Fgf15 Expression in Mäusen direkt durch den vermuteten transkriptionellen Mechanismus, der eine VDR-Bindung an den Fgf15 Promoter voraussetzt, reguliert wird.

In unseren humanen Testreihen wurden den Zellmedien als nächster konsequenter Schritt, die nukleären Agonisten VD<sub>3</sub>, CDCA und 9-cis RA beigefügt und deren Auswirkung auf die FGF19 Induktion betrachtet. Als Wirkungskontrolle für die gewählten Substanzen wurde zusätzlich für CYP24A1 (VD<sub>3</sub>), CYP26A1 (RA) und IBABP (CDCA) getestet, was wiederum die Verwendbarkeit aller drei Agonisten belegte. Durch diese Testreihe konnten wir

nachweisen, dass die humanen HT-29 Zellen ein anderes Verhalten zeigten, als das von Schmidt et al. in Mäusezellen beschriebene [75]. Im Gegensatz zu den in der Maus gefundenen Erkenntnissen, konnte durch die Zugabe von VD3 keinerlei Steigerung des FGF19, noch ein messbarere Unterschied zur EtOH-Kontrolle festgestellt werden. Unsere verwendeten Zellen, waren im Kontext vergleichbar mit den Wildtypmäusen von Schmidt et al., da sie keinerlei genetischer Modifikation unterlagen und dadurch eine unveränderte physiologische Reaktion darlegten. Durch das oben beschriebene und dokumentierte Verhalten, ergaben sich unsere Rückschlüsse auf den bestehenden Unterschied zwischen Mäuse und Menschen.

Da unser erster Versuch über einen 24-stündlichen Zeitrahmen stattfand, wurde ein zusätzlicher Zeitreihenversuch mit VD3 durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Faktors Zeit zu erörtern. Allerdings zeigte sich zu keinem der fünf gewählten Zeitpunkte eine Veränderung in der FGF19 Expression. Ein leichter Anstieg in der FXR-Expression, die simultan bestimmt wurde, konnte jedoch gemessen werden. Auch zu dem von Schmidt et al. verwendeten Zeitpunkt von 4 h, zeigte sich in unseren Zellen keinerlei signifikante Veränderung der FGF19 Expression. Ein weiterer Unterschied zeigte sich allerdings bei der gemessenen FXR Expression die, noch stärker als in den Mäusen gemessen, in unseren Zellversuchen nachweislich anstieg.

Beide gewonnenen Ergebnisse zeigten deutlich, dass die von Schmidt et al. beschriebenen Effekte im Mausmodell für Fgf15, sich in humanen Zellen in vitro, unter Verwendung des nukleären Agonisten VD3, nicht demonstrieren lassen. Ob diese Tatsache auf echten speziesspezifischen Unterschieden begründet ist, oder lediglich eine spezifische Zelllinieneigenschaft der HT-29 darstellt, sollte durch weiterführende Studien unter Verwendung von zusätzlichen humanen Zelllinien, idealerweise durch ilialen Biopsien erörtert werden. Eine Vitamin D induzierte Expressionssteigerung des FGF19, ähnlich wie im Mausmodell, konnten wir in unseren Versuchen im humanen Zellmilieu nicht nachweisen.

## 4.2.2 Einflüsse des CDCA auf FXR und FGF19

Die mannigfaltigen Einflüsse der Gallensäuren konnten bereits in multiplen Studien und so auch in unseren Versuchen nachgewiesen werden. [34, 35, 91]

In ihrer bereits 2003 veröffentlichten Studie, konnte Holt et.al eindeutige Beweise über die Effektivität von künstlichen und natürlichen FGF19-Induktoren und deren Wirkung auf menschliche Hepatozyten darlegen. Hierzu diente ihnen einerseits der synthetische FXR-Agonist GW4064, der bereits von Maloney et al. 2000 beschrieben wurde [47], andererseits verzeichneten sie ebenfalls einen Expressionsanstieg unter der Verwendung der natürlich vorkommenden Gallensäure CDCA. Während sich in ihren Kontrollzellen keine FGF19 mRNA nachweisen lies, kam es in den mit GW4064 oder CDCA behandelten Zellen zu verlässlichen Anstiegen. Diese zeigten zusätzlich eine Dosisabhängige Expressionskorrelation und waren spezifisch für das FGF19, während andere FGFs z.B.: -1, -2, -21, -22 keine Anstiege präsentierten [48].

Die beobachteten Effekte lassen sich auch in anderen Geweben demonstrieren, wie Inagaki et al in ihren Versuchen mit murinen Ileum beweisen [45].

In humanen Ileumsbiopsien gelang es Zhang et.al. 2013 einen ähnlich eindeutigen Beweis für die CDCA Effektivität in der FGF19-Aktivierung zu demonstrieren. Zusätzlich zeigte sich der synthetische FXR-Agonist Obeticholsäure als nochmals um ein vielfaches potenter. Ein Fazit das Zhang und Kollegen aus ihren Versuchen zogen, war die Tatsache das Gallensäuren einen unbestreitbaren Einfluss auf die menschliche FGF19-Expression im Ileum hatten.

Ob als einziger Ausscheidungsweg des Körpers für angereichertes Cholesterin, oder Lösungsmittel für Fette oder fettlösliche Vitamine, die Gallensäuren spielen eine essenzielle Rolle im menschlichen Stoffwechsel [92, 93].

In Übereinstimmung mit unseren Überlegungen und öffentlich zugänglicher Literatur, zeigte das CDCA zu frühen Messzeitpunkten (zwei bis vier Std.) eine Induktion von FXR und FGF19 [34, 35]. Die Effektivität auf die FXR-Expression war dabei deutlich geringer als die des FGF19. Beide Expressionssteigerungen

war zudem nur kurzlebig. Eine längere Behandlung mit CDCA (24 Std.) erbrachte sogar einen gegenteiligen, verminderten Effekt auf die FGF19 Expression. Die vorgeschaltete FXR-Expression der verwendeten HT-29 Zellen war nach 24 Stunden wieder auf dem Niveau der EtOH-Kontrolle angekommen. Als möglicher Grund für dieses von uns beobachtete Phänomen, würden sich allerdings mehrere Erklärungsmodelle anbieten. Einerseits könnten die von uns verwendeten Konzentrationen über den langen 24h Messzeitraum, durchaus zelltoxische Eigenschaften entwickeln. Weitere Versuchsreihen mit unterschiedlicheren Konzentrationen könnten hierüber Aufschluss geben. Andererseits könnte ein einfacher Wirkungsverlust der verwendeten Substanzen oder eine Produktionserschöpfung der sich in einem geschlossenen System befindlichen Zellen dahinter stecken. Plausibel erscheint auch der bereits gut erkundete negative Feedback-Mechanismus über das Cyp7a1. In diesem Kreislauf kommt es durch die Hochregulierung der FGF19-Expression durch FXR zu einer Herabregulierung des Cyp7A1 über den FGFR4. Letzteres führt wiederum zu einer stark verminderten Gallensäuresynthese [48].

Ob der Feedback-Mechanismus, der in vivo einer körpereigenen Schutzreaktion vor zu hohen Gallensäurespiegel gleichkommt, eine wirklich entscheidende Rolle spielt, darf in Anbetracht der durch 9-cis RA ähnlichen Zellreaktionen erbrachten Ergebnisse angezweifelt werden.

Die genauere Untersuchung dieses Verhaltens um die Gründe der Langzeitwirkungen der Gallensäuren und deren Effekte besser zu verstehen, sollte mit weiteren Versuchen erörtert werden. Hierdurch könnte eine gezieltere und effektivere Expressionssteigerung des FGF19 erreicht werden.

### **4.2.3 Vitamin A als neuartiger FGF19 Regulator**

In ihren weiterführenden Überlegungen über die Effekte der fettlöslichen Vitamine, untersuchten Schmidt et al. auch das Expressionsverhalten ihrer Testmäuse unter Einfluss von Vitamin A. Hierbei könnten sie feststellen das es nach der Behandlung mit 9-cis RA, einem dualen Aktivator des RXR und RAR,

ebenfalls zu einer Cyp7a1 Unterdrückung kommt. Fortführende Überlegungen über die verschiedenartigen regulativen Heterodimere und Versuche mit Vitamin A Behandlungen von FXR -/- Mäusen, erbrachten Einsichten über die direkte Abhängigkeit von FXR für die Fgf15 Expression. Durch diese Versuchsreihe gelangen Schmidt et al zu dem Fazit, dass die durch Vitamin A induzierte Fgf15 Expression über den RXR-Anteil des RXR/FXR-Heterodimers geschieht [75].

Gleichermaßen, wie im von Schmidt et al. beschriebenen Mausmodell, konnten wir eine verstärkte FGF19 Expression nach der Zellbehandlung mit dem Vitamin A Derivat 9-cis RA feststellen[75]. Im Gegensatz zu CDCA zeigte 9-cis RA einen starken und konstanten Effekt auf die FGF19 Expression der HT-29 Zellen zu jedem der getesteten Zeitpunkte. Hiermit beschreiben die von uns gewonnenen Daten 9-cis RA als einen neuartigen, potenten Regulator der FGF19 Genexpression in humanen, enterozytenähnlichen HT-29 Zellen. Beachtenswert hierbei war vor allem die Effizienz des Vitamin A Derivates über den gesamten beobachteten 24 stündigen Zeitraum. Die Tatsache das sich verglichen mit CDCA, zu jedem Messzeitpunkt stets höhere Expressionswerte fanden und zusätzlich auch kein Abfall unter den Wert der EtOH-Kontrolle fand, verdeutlicht einerseits die Signifikanz des 9-cis RA als FGF19-Induktor und andererseits den scheinbaren Mangel eines zytotoxischen Potenzials.

Eine weitere Überlegung zum Versuchsaufbau resultierte in der Wiederholung des vorhergehenden Versuchs, unter Verwendung eines Gemisches aus CDCA und RA mit den zuvor bereits verwendeten Konzentrationen. Der dem zugrundeliegenden Gedanke war, dass eine Mischung beider Agonisten mehr den natürlichen in vivo Bedingungen des menschlichen Stoffwechsels entspreche, in welchem eine solitäre Aussetzung der Zelle gegenüber nur einen Wirkstoffes faktisch nicht stattfindet. Zudem sollte ein von uns vermuteter und potenziell möglicher Synergismus beider Substanzen untersucht werden. Diese Hypothese stützten wir auf die zahlreichen literarischen Quellen, die die Funktion und Bedeutung der unterschiedlichen Heterodimere, variierende Zusammenschüsse diverser Rezeptoren wie z.B.: RXR/RAR, vermuteten und

teilweise bewiesen[68, 83, 85, 86]. Da jede Komponente eines Heterodimers es vermag, unterschiedliche nachgeschaltete Prozesse zu beeinflussen, war es für uns von großem Interesse zu erforschen, ob und in welchem Ausmaß eine CDCA/9-cis RA Kombination einen Effekt auf die FGF19 Expression erbringen würde.

Die von uns beobachteten Testergebnisse demonstrierten eine wesentlich stärkere FGF19 Induktion durch die Mischung, als durch die jeweiligen Einzelsubstanzen. Dieser neuartige Effekt zeigte sich zu jedem einzelnen Messzeitpunkt. Der zeitliche Verlauf der Induktionskurven gleicht zudem mehr denen des 9-cis RA als denen des CDCA. Hierdurch lässt sich dessen Hauptrolle in den beobachteten zellulären Reaktionen vermuten. Dieser erstmals beobachtete Effekt war besonders zu den späteren Testzeitpunkten (8-24 Std) bemerkbar. Obwohl sich zum Messzeitpunkt 8 Std. eine einmalige aber nicht vernachlässigbare Fehlerabweichung zeigte, war es uns trotzdem möglich, einen starken Synergismus zwischen RA und CDCA zu zeigen.

Als eine mögliche Ursache, vermuteten wir eine gesteigerte CDCA-Aktivität unter RA Einfluss. Im Mausmodell reduziert Vitamin A (Retinylpalmitat) drastisch die Gallenproduktion in der Leber, durch eine Unterdrückung von Cyp7a1 und eine Erhöhung von FGF15 [48, 75]. Somit könnte Vitamin A bzw. seine Derivate wie z.B. RA diverse Mechanismen auslösen, die den Effekt von CDCA und FXR auf intestinale Zellen verstärken, um eine noch schnellere und bestimmtere negative Rückmeldung auszulösen. Die ablaufenden Prozesse könnten zum Schutz vor zu hohen, möglicherweise toxischen Gallensäurelevels dienen. Die Auswirkungen zu hoher Gallensäurespiegel gelten mittlerweile als gut bekannt und sollen ausführlicher unter 4.5 erörtert werden [94, 95].

Um diesen neu entdeckten Synergismus weiter zu ergründen, folgerten wir, dass der vorgeschalteten Aktivierung des FXR möglicherweise eine Schlüsselrolle in diesem regulativen Prozess zukommt. Für eine konkrete Vergleichbarkeit wurde unter gleichwertigen Testbedingungen (Zeitreihenversuch mit gleichen Messzeitpunkten) die Zellen nach ihrer FXR Expression nach Zugabe von CDCA, RA und deren Kombination untersucht.

Die Mischung aus RA und CDCA zeigte erneut einen ähnlichen synergistischen Effekt auf die FXR Expression wie bereits zuvor auf die des FGF19, allerdings mit einem früheren Anstieg und Maximum an FXR, sowie einem gleichermaßen Verlust an Effektivität zur 24 Std.-Messung.

Zur noch genaueren Überprüfung unserer Ergebnisse führten wir Western blots durch. Das von uns verfolgte Ziel hierbei war die Betrachtung der, im Anschluss an die transkriptionellen Zellabläufe anknüpfenden proteinbildenden Prozesse. Die Western blots waren als eine entscheidende Kontrolle gedacht, ob die intrazellulären Induktionsereignisse auch Einfluss auf höhergeschaltete, komplexere Prozesse, wie eben die der Proteinbildung, zeigten. Sollten sich unsere Vermutungen bestätigen, erhofften wir uns dadurch eine zusätzliche Validierung unserer Daten.

Diese wurde durch die Western blots auch erbracht, da sie gleiche Ergebnisse zu den Messzeitpunkten 8 und 24 Std. auf der Proteinebene zeigten. Erneut wurde zum 8 Std. Messzeitpunkt der klar stärkere Effekt verzeichnet.

Unter Berücksichtigung unserer bis hier ermittelten Daten, lässt sich vermuten, dass der beobachtete synergistische Effekt von 9-cis-RA und CDCA zumindest teilweise durch die von 9-cis RA verursachte Hochregulierung des FXR-Proteins bedingt sein könnte.

#### **4.2.4 Neue Erkenntnisse zum Einfluss der RXR/RAR-Achse auf die Regulation des humanen *FGF19* Gens und Unterschiede zum murinen System**

Da bereits Schmidt et al. [75] einen möglichen Einfluss des FXR/RXR-Heterodimers auf die erhöhten FGF15 Levels in der Maus vermuteten, griffen wir diesen Gedanken weiter für unsere folgenden Versuche in unserem Zellmodell auf.

Nach der Zugabe von spezifischen RXR (MA) und RAR (TTNPB) Agonisten, zeigten die menschlichen Zellen allerdings erneut ein anderes Verhalten als die Mäusezellen. Durch die gezielte Aktivierung des RAR konnte ein starker Anstieg der FGF19 gemessen werden, während durch die gleichermaßen spezifische Ansteuerung des RXR, ein ebenfalls markanter Anstieg des FXR nachweisbar wurde. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde zudem 9-cis RA verwendet, durch das sich eine stärkere Induktion des FGF19 als des FXR zeigte. Durch diese Ergebnisse schlussfolgerten wir, obwohl Vitamin A Derivate anscheinend als konservierte positive Regulatoren des FGF15/19 in Menschen sowie Mäusen wirken, müssen subtile speziesspezifische Unterschiede in den Signalwegen der nukleären Rezeptoren und ihren Agonisten existieren.

Um derartige genetische Unterschiede noch genauer zu ergründen, wurden im Labor für molekulare Hepatologie des Universitätsklinikums Würzburg, noch weiterführende Versuche realisiert.

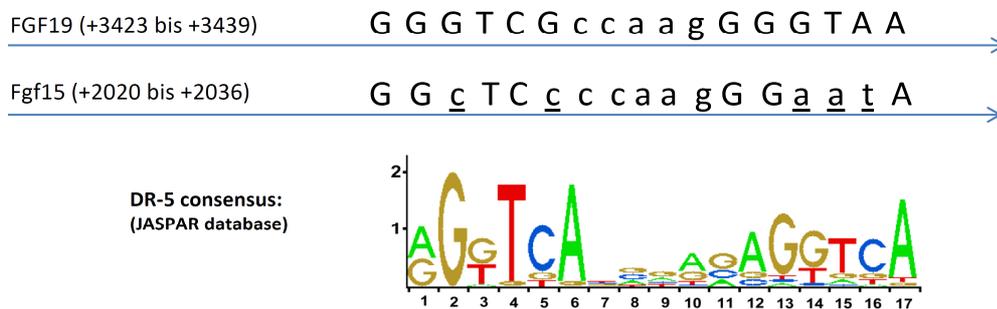
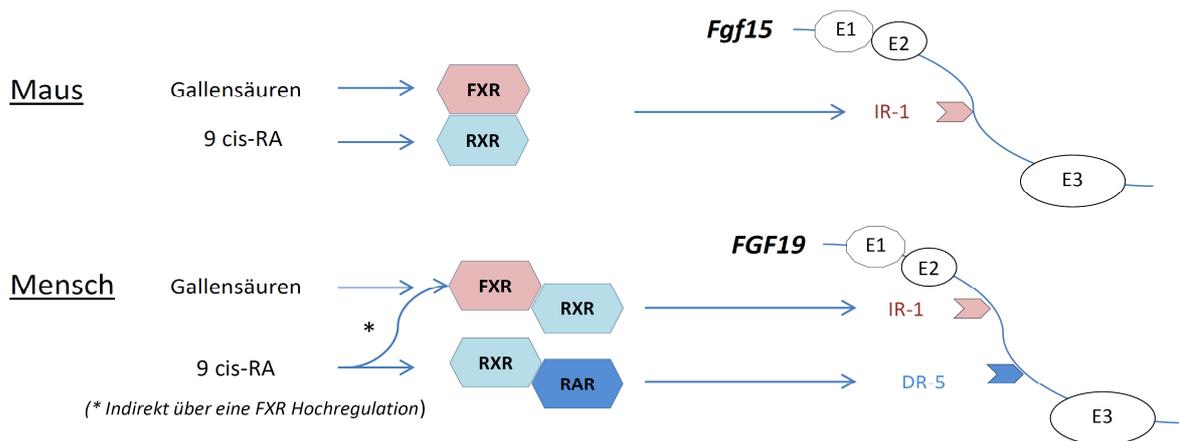
Diese Versuche wurden zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zu einer abschließenden Publikation zusammengefasst. Die durchgeführten Versuche umfassten Immunfluoreszenz-Analysen, Versuche mit siRNA-vermitteltem „knock-down“ von FXR und RAR, Chromatin-Immunpräzipitationen und Reporter-Gen-Analysen. Diese Untersuchungen beleuchten weitere molekulare Details der Aktivierung des humanen *FGF19* Gens durch Vitamin A und seine Derivate und lassen wichtigen Schlussfolgerungen zu, die Aufschluss darüber geben wie sich die entsprechenden regulatorischen Prozesse auf molekularer Ebene zwischen Maus und Mensch unterscheiden. Eine Übersicht über die relevanten Erkenntnisse gibt Abbildung 12.

Diese zeigt eindrucksvoll wie Vitamin A und dessen Derivate über den FXR/RXR Heterodimer die Fgf15 Expression in der Maus induzieren. Vermutlicher Weise kommt dem FXR hierbei eine zentrale Rolle zu. Diese besteht womöglich in der Zusammenführung der Gallensäuren und Vitamin A Signaturen über einen einzelnen NR-Signalweg.

Im humanen Model wiederum, induziert Vitamin A das FGF19 über einen anderen Weg. Im menschlichen System, löst die Aktivierung des RAR die FGF19-Expression über einen direkten transkriptionellen Mechanismus aus. Das auf Intron 2 gelegenen DR-5 Element spielt hierbei eine entscheidende Schlüsselrolle. Auf den Ebenen der mRNA und der Proteine, kann Vitamin A über die Aktivierung des RXR, eine Hochregulierung des nukleären Gallensäurerezeptors FXR bewirken. Dieser unter 3.3.3 & f. bereits beobachtete und beschriebenen Synergismus, erlaubt es dem Vitamin A unter Beisein der Gallensäuren über den FXR indirekt FGF19 zu induzieren.

Das auf Intron 2 gelegene IR-1 Element, ist eines von mehreren, die die Anbindung des FXR auf das FGF19-Gen vermitteln [48, 96, 97]. Während Menschen und Mäuse gleichermaßen dieses IR-1 Element besitzen [45], fehlt das im menschlichen FGF19-Gen bereits nachgewiesenen DR-5 Element augenscheinlich im Mausgenom. Die einzelnen Unterschiede im Basencode beider Organismen zeigt dabei ein genauer Frequenzvergleich auf.

Einen ebenfalls genauen Aufschluss über die räumliche Position der jeweiligen genetischen Promoterregionen sowie die der entsprechenden Sequenzmotive z.B.: IR-1 und DR-5 konnte von Miyata et al und ihren Affinitätselektrophoresen (engl. Electrophoretic Mobility Shift Assays - kurz EMSA) gezeigt werden [97].



**Abbildung 12: Spezifische Mechanismen der Vitamin A regulierten Expression von FGF19 und *Fgf15*.**

Vitamin A und dessen Derivate induzieren über den FXR/RXR Heterodimer die *Fgf15* Expression in der Maus. Hierbei lässt sich vermuten, dass dem FXR eine zentrale Rolle in der Zusammenführung der Gallensäuren und Vitamin A Signaturen über einen einzelnen NR-Signalweg zukommt. Im humanen Model induziert Vitamin A FGF19 über einen andersartige Kaskade: Die Aktivierung des RAR induziert die Expression von FGF19 über einen direkten transkriptionellen Mechanismus. Eine Schlüsselrolle hierbei spielt das in Intron 2 gelegenen DR-5 Element. Auf mRNA und Proteinebene können Vitamin A und dessen Derivate, über die Aktivierung des RXR, eine Hochregulierung des nukleären Gallensäurerezeptors FXR bewirken. Dieser Synergismus erlaubt es dem Vitamin A über den FXR unter Beisein von Gallensäuren, somit indirekt FGF19 zu induzieren. Das IR-1 Element in Intron 2 ist eines von mehreren, die die Anbindung des FXR an das *FGF19*-Gen vermitteln [45, 48, 97]. Während Menschen und Mäuse das IR-1 Element in Intron 2 gleichermaßen besitzen [45], scheint das DR-5 Element das im menschlichen FGF19 Gen nachgewiesen wurde, im Mausgenom zu fehlen. Diverse Unterschiede im nukleotiden Code können bei einem genauen in silico Sequenzvergleich entdeckt werden. Einen ebenfalls genauen Aufschluss über die räumliche Position der jeweiligen genetischen Promoterregionen sowie die der entsprechenden Sequenzmotive z.B.: IR-1 und DR-5 konnte von Miyata et al und ihren Affinitätselektrophoresen (engl. Electrophoretic Mobility Shift Assays –ESMA) gezeigt werden [45, 48, 96, 97].

### 4.3 Stärken und Schwächen

Die vorhergehende Auswahl der epithelialen Kolonzellen und deren bereits gut beschriebenen Eigenschaften, sollte als Versuchsstärke beachtet werden. Wir

entschieden uns für das humane Zellmodell aus unterschiedlichen Gründen. Hauptsächlich war, dass kein anderer tierischer Stoffwechsel vollständig und in allen Aspekten dem menschlichen Metabolismus gleicht. Hierdurch ergaben sich, wie von uns im Verlauf der Versuche gezeigt, diverse nicht vernachlässigbare Abweichungen mit etwaigen Konsequenzen im Vergleich zu den publizierten Daten aus Mäusen (Schmidt et al.). Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Erkenntnisse könnten demnach für eine potentielle Anwendung von Vitamin A Derivaten zur Modulation von FGF19 im Menschen aus klinischer Sicht hochrelevant werden.

Die verwendeten Zellkulturmedien, Kultivierungs- und Versuchsbedingungen, welche durch zuvor gewonnene Erfahrungen aus der Zellkulturetablierung festgelegt wurden, zeichneten sich durch eine verlässliche Reproduzierbarkeit aus. Dadurch wurde es möglich, gleichwertige Bedingungen für jeden Versuch zu garantieren und folglich eine erhöhte Vergleichbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse zu gewährleisten. Es sollte dennoch erwähnt werden, dass trotz enger Kontrolle und Regulation die Nährmittelzufuhr sowie das jeweilige Entwicklungsstadium der Zellen doch nur bis zu einem gewissen Grad überwacht und beeinflusst werden konnten. Eine dadurch mögliche Beeinflussung der Ergebnisse lässt sich folglich nicht vollständig ausschließen. Offensichtliche Limitationen dieser Versuchsaufbauten ergeben sich aus den beobachteten geschlossenen Systemen. Durch die verminderte Kommunikationsfähigkeit mit vor- bzw. nachgeschalteten Systemen von in-vitro kultivierten Zellen, könnten sich direkte Einflüsse auf die sofortigen so wie latenten Zellantworten auf die jeweiligen Behandlungen ergeben.

Betrachtet man die Messfehler, so zeigen sich bei einem Großteil unserer Ergebnisse nur geringfügige Abweichungen und somit eine gute Verlässlichkeit dieser Resultate. Bei zwei Messungen stellten wir größere Abweichungen als bei den anderen Tests fest. Diese Zeitpunkte waren die 8 h CDCA + 9-cis RA für FGF19 und die 8 h 9-cis RA für FXR. Obwohl beide Messwerte unter Vorbehalt betrachtet werden sollten, ergaben sich für beide Zeitreihenversuche,

die diese beiden Ergebnisse enthielten, gesamt betrachtet nur geringe Messfehler und somit eine gute Verwertbarkeit der Resultate.

Alle Zellen und geerntetes Material wurden stets gleichermaßen analysiert und mit denselben Materialien und Methoden wie unter 2.1 beschrieben verarbeitet. Diese Prozessstandardisierung garantierte eine noch bessere Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten.

## **4.4 Zukünftige Studien**

Die von uns durchgeführten Versuche und die daraus gewonnenen Ergebnisse zeigten weitere komplexe und eng verstrickte Systeme auf. Da zu diesen noch wenig detaillierte Erkenntnisse zur Verfügung stehen, sollten weitere Studien für ein besseres Verständnis dieser biomolekularen Mechanismen durchgeführt werden.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit einzig die HT-29 Zelllinie von uns betrachtet wurden, raten wir an, dass vergleichbare Tests mit einer größeren Vielfalt an Zellen vollzogen werden. Neben verwandten Kolonadenomzellen, wie den zu Beginn beschriebenen Caco-2, sollten Zellen unterschiedlichen Ursprungs (z.B.: HepG2 Zellen vom hepatischen Typ) verwendet werden. Dadurch könnte sich ein noch detaillierterer Einblick in die versteckten Rezeptorwege ermöglichen, sowie eine bessere Vergleichbarkeit der gesammelten Daten ergeben. Durch die Erstellung einer ausführlichen Übersicht der Rezeptoren in den unterschiedlichen Geweben, ließen sich möglicherweise die Zusammenhänge und gegenseitigen Beeinflussungen besser verstehen und nachvollziehen. In der Tat wurden erste Testreihen in Caco-2 Zellen im Anschluss an diese Arbeit im Rahmen der unter Punkt 4.2.4 beschriebenen, weiterführenden Versuche im Labor für molekulare Hepatologie bereits durchgeführt. Diese Versuche zeigen ebenfalls eine Aktivierung der FXR und FGF19 Expression durch Stimulation mit 9-cis RA.

Wie bereits oben beschrieben besteht durchaus ein offensichtlicher Bedarf an Testreihen mit frischen menschlichen, ilialen Biopsien, um die Abläufe im

gesunden Gewebe besser zu durchleuchten. Jedes kanzerogene Gewebe stößt an gegebene Grenzen, in der Darstellung der natürlichen Verhältnisse.

Zusätzlich sollte eine größere Variation an Konzentrationen für die verwendeten Agonisten untersucht werden. Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen könnte dazu beitragen, die optimalsten Dosierungen zu bestimmen sowie wirkungslose und zellletale Dosen abzugrenzen. Durch die Ermittlung der idealen Wirkbereiche würde sich das gewünschte Expressionsmaximum, im Hinblick auf weitere Testreihen und mögliche zukünftige Versuche mit therapeutischem Ansatz, effizienter und schneller einstellen lassen.

Als bereits vielfach beschriebener Schlüsselbereich des menschlichen Organismus sollte weiterhin ein forschendes Augenmerk auf den Gallensäurezyklus gerichtet werden. Besonders, da unsere Versuche mit CDCA zwar einen anfänglichen Anstieg, aber dann einen kontinuierlichen Abfall der FGF19 Expressionsrate zeigten. Die dem zugrunde liegenden Mechanismen sollten von großem Interesse für all diejenigen sein, die ein tieferes Verständnis für die Effekte von CDCA auf den hepatischen und intestinalen Gallensäurezyklus anstreben. Obwohl eine konstant wachsende Datensammlung an Informationen über den BAC bereits umfassendes Verständnis gewährt, ist es dennoch immer noch offenkundig, dass dieses gut vernetzte metabolische System noch viele weitere neue Erkenntnisse birgt.

Da Vitamin A die am vielversprechendsten Effekte auf die FGF19 und FXR Induktion zeigte, sollten klinische Studien und mögliche Ernährungsversuche mit unterschiedlichen menschlichen Testprobanden ein logischer Schritt sein. Im Hinblick auf therapeutische Anwendbarkeit sollten noch weitere Studien einen Fokus auf 9-cis RA setzen und dessen Effekte auf die menschliche FGF19 Expression weiter aufdecken.

## **4.5 Klinische Bedeutung und Anwendbarkeit**

Mit zunehmend verfügbarem Wissen über die Fibroblast Growth Factor Familie und ihrer Untergruppe FGF19, 21 und 23 sowie den Farnesoid X Rezeptor, kann mit weiteren Einsichten über den menschlichen Stoffwechsel und den vielseitigen, biochemischen Prozessen gerechnet werden. Das gründliche Verständnis dieser diffizilen Wirkungspfade und Mechanismen ist obligat, um etwaige pathologische Anzeichen und deren teils drastische Einflüsse auf den menschlichen Körper rechtzeitig zu erkennen. Durch die sichere Identifizierung dieser Anzeichen würde sich eine frühzeitige Prävention und Intervention zur Vermeidung oftmals schwer verlaufender Erkrankungen ermöglichen.

Die engen Beziehungen in denen FGF19 mit dem menschlichen Metabolismus steht, sowie dessen Homöostase bzw. deren Verlust, wurden zuletzt von zahlreichen Forschungsgruppen und Studien untersucht.

### **4.5.1 Chologene Diarrhö**

Neben ihrer Unverzichtbarkeit für den menschlichen Stoffwechsel können Gallensäuren und ihre schwankenden Serumniveaus auch zu zahlreichen Komplikationen und Krankheiten führen. Eine dieser ist die Gallensäurediarrhö (engl. bile acid diarrhoea – kurz BAD), die durch eine primäre Genese, häufiger allerdings durch einen sekundäre Ursachen wie z.B. gastrointestinalen Erkrankungen und/oder Resektionen entsteht [94].

Es überrascht wenig, dass viele dieser Patienten erniedrigte Serumlevel diverser metabolischer Botenstoffe und Metaboliten aufweisen, unter anderem auch ein vermindertes FGF19.

In ihrer Studie mit Obeticholischer Säure, einem potenten FXR Agonisten, versuchten Walters et al. durch die Aktivierung verantwortlicher FGF19-induzierender Rezeptoren, mögliche klinische Vorteile für eine Gruppe von BAD-Patienten zu ermitteln. Bei der Verwendung von drei unterschiedlichen

Testgruppen (Probanden mit primärer BAD, sekundärer BAD und einer Kontrollgruppe) war es ihnen möglich, beachtliche Resultate zu erzielen. Nach einer zweiwöchigen Behandlung mit Obeticholischer Säure von täglich 25 mg, zeigten sich gesteigerte FGF19 Level, während sich die Defäkationsfrequenzen, abdominale Schmerzen und Dringlichkeitsbeschwerden in ihrem Schweregrad verringerten. Obwohl sich die FGF19 und Gallensäureniveaus auch in der gesunden Kontrollgruppe veränderten, wurden keine Nebenwirkungen angegeben [95].

## **4.5.2           Metabolisches Syndrom**

Die Bezeichnung Metabolisches Syndrom (engl. metabolic syndrom (MetS)) steht für die Zusammenfassung diverser metabolischer Dysfunktionen und folglich Risikofaktoren, für das kardiovaskuläre System des Menschen. Etwas genauer betrachtet, gehören zu diesen Fehlfunktionen; ein gestörter Kohlenhydratstoffwechsel, der sich in einer erhöhten Insulinresistenz zeigt (Diabetes mellitus Typ 2, DMT2), Bluthochdruck mit Werten > 130/85, Dyslipidämie und abdominelle Fettleibigkeit. Eine alarmierende Anzahl von 34% der Erwachsenen, hauptsächlich in westlichen Kulturkreisen, mit deren hochkalorischer Ernährung und geringem Energieverbrauch, erfüllen derzeit diese Kriterien [98].

Auf Grund dieser Tatsache wurde die Breite und Vielzahl der damit verbundenen persönlichen, sozialen und finanziellen Probleme bereits vielfach erörtert und beschrieben.

Für einige der erwähnten gesundheitlichen Komplikationen finden sich bereits erfolgsversprechende Präventions-, Diagnose- und Therapieansätze. Zu diesen zählen auch die FGFs

Eine nachweisliche Verbindung zwischen FGF19 und dem metabolischen Syndrom wurde bereits festgestellt, als man die basalen Serumniveaus Erkrankter mit denen gesunder Testprobanden verglich. Während weder Alter noch Geschlecht einen Einfluss auf die gemessene Menge an FGF19 hatten,

zeigte sich ein bis zu 65% erniedrigter FGF19-Serumspiegel in Patienten mit MetS, verglichen mit Stoffwechselgesunden [99].

### **4.5.3 Adipositas**

Übergewicht und Fettleibigkeit, Kriterien des MetS, haben als eigenständiges Krankheitsbild bereits einschneidende Auswirkungen auf die Gesundheit des menschlichen Körpers. Unter der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Therapien, die von fadenscheinigen Versprechungen bis zu validierten Behandlungen reichen, zählt aufgrund ihrer belegten Effektivität die chirurgische Intervention. Auch hier konnte eine Verbindung mit FGF19 gefunden werden.

Einige Studien konnten demonstrieren, dass die FGF19 Level in adipösen Patienten durchschnittlich niedriger liegen, als die gesunder Vergleichsgruppen [50, 100]. Nach der Durchführung unterschiedlicher chirurgischer Eingriffe, wie der laparoskopischen Ärmelgastrektomie, verbesserten sich die vormals erniedrigten Werte mit einer Normalisierung auf das Niveau der gesunden Kontrollgruppe [101].

Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Patienten, die sich einer Roux-en-Y Magenbypass Operation (engl. RY gastric bypass – kurz RYGB) unterzogen, beobachtet. Neben den erwünschten und erwarteten Ergebnissen einer Gewichtsreduktion und einer erhöhten Insulinsensitivität verringerte sich zusätzlich der allgemeine Fettanteil des Lebergewebes. Außerdem konnte ein Anstieg von FGF19 und FGF21 sowie Serumgallensäuren gemessen werden. Nachdem sie die Daten ihrer Versuchsprobanden analysiert hatten, spekulierten Jansen et al., dass erhöhte post-operative FGF19-Level einen positiven Einfluss auf den Glukosestoffwechsel und die hepatische Fettverwertung haben könnten [102].

Weitere Untersuchungen für diese chirurgische Methode der Gewichtsreduktion wurden von Gerhard et al. durchgeführt. Für einen noch detaillierteren Einblick in die Beziehungen dieser biologischen Transmitter wurden eine weitere Einteilung der Patienten unternommen und diese in Diabetiker und Nicht-diabetiker eingeteilt. Vor und nach den Operationen, wurden die Serumwerte

erhoben und verglichen. Während das durchschnittliche Körpergewicht beider Gruppen im Vergleich, keinen Einfluss auf die FGF19 Niveaus hatte, wurde schnell ersichtlich, dass Nichtdiabetiker präoperativ höhere FGF19- und niedrigere Gallensäurewerte zeigten, als die diabetische Patientengruppe. Nach den Roux-en-Y-Operationen wurde in den Diabetikern ein stärkerer Anstieg sowie bei einigen die Ausheilung des Diabetes beobachtet. Als finale Schlussfolgerung zogen Gerhard et al. eine Verbindung zwischen den RYGB und der FGF19-BA-Achse als mögliche Ursache der Diabetesgenese [103].

#### **4.5.4 Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)**

Die hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms stellt die nicht-alkoholische Steatohepatitis, kurz NASH (engl. Non-alcoholic fatty liver disease – NAFLD). Durch die kontinuierlich zunehmende Inzidenz an Patienten mit MetS steigt ebenfalls die Anzahl der NAFLD und deren variierenden Erscheinungsformen, die von einer reversiblen Fettleber bis zum inkurablen Endstadium zahlreicher Leberpathologien, der Leberzirrhose, reichen [104].

Da sich noch einige entscheidende Pathomechanismen dem genaueren wissenschaftlichen Verständnis entziehen, besteht ein vielversprechender Ansatz in der Identifizierung möglicher Biomarker, mit deren Hilfe sich eine rechtzeitige und verlässliche Detektion der Frühstadien ermöglichen soll.

Diesen Grundgedanken verfolgte eine Studie von Eren et al. 2012. Hierbei wurden die FGF19-Serumlevel von 91 NAFLD-Patienten (durch Biopsien gesicherten) erfasst und mit 74 Kontrollprobanden verglichen. Es zeigte sich, dass die FGF19-Spiegel der NAFLD-Gruppe deutlich unter denen der gesunden Kontrollgruppe lagen. Kein Unterschied zeigte sich allerdings bei einer weiteren Unterteilung der NAFLD-Patienten in Studienteilnehmer mit und ohne Metabolischem Syndrom. Aus ihren Ergebnissen schlussfolgerten Eren et al., dass FGF19 eine mögliche Rolle in der Pathophysiologie der nicht-alkoholischen Steatohepatitis spielen könnte, jedoch bezweifelten sie die Verwendbarkeit des FGF19 als entscheidender Biomarker dieser speziellen Leberpathologie [105].

Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen FGF19, FGF21,  $\beta$ -Klothos und NAFLD konnte von Alisi et al. gefunden werden. In der 2013 von ihnen durchgeführten Studie mit 84 pädiatrischen NAFLD-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe. Hierbei zeigte sich eine entgegengesetzte Abhängigkeit von FGF19, 21 und  $\beta$ -klotho und der Wahrscheinlichkeit einer NASH und/oder einer Leberfibrose. Die Klotho-Corezeptoren konnten als NASH-Prädiktoren herangezogen werden und waren direkt mit der Expression von FGF19 und FGF21 verbunden [106].

#### **4.5.5 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten**

Die pathologische Fehlregulation des FGF19-Haushalts stellt eine zentrale Gemeinsamkeit der oben beschriebenen Krankheitsbilder dar. Aufgrund dieser Tatsache drängt sich die Vermutung auf, dass sich hier auch potenzielle therapeutische Ansatzpunkte für medikamentöse Behandlungen ergeben könnten.

Bei einem nachgewiesenen Mangel an FGF19 könnte eventuell durch dessen individuell angepasste Applikation eine Reduktion des jeweiligen Krankheitsbildes erzielt werden. Dies konnte bereits ansatzweise durch Marcelin et al. in ihren Mäuseversuchen demonstriert werden [52]. Weitere klinische Studien auf diesem Gebiet könnten vielversprechende Ergebnisse erbringen.

Neben einer direkten FGF19-Substitution würde sich auch über Zugabe von FGF19-induzierenden Substraten eine indirekte Induktion und folglich gesteigerte FGF19-Serumlevel erreichen lassen. Ein vergleichbar ähnlicher Ansatz wurde bereits unter 4.5.1 beschrieben. Da unsere Versuche die Effektivität von Vitamin A Derivaten auf den FGF19-Spiegel belegen, könnte eine gezielte Applikation dieser Substanzen (alleinständig oder in Kombination mit Weiteren) über eben diesen Ansatzpunkt, mögliche mindernde Auswirkungen auf die Pathophysiologien der Krankheitsbilder haben.

Eine weitere Verwendungsmöglichkeit des FGF19 in Hinsicht auf medizinische Verwendbarkeit ergibt sich aus seiner potenziellen Tauglichkeit als diagnostischer Biomarker für unterschiedliche Krankheitsbilder. Obwohl diese

Eigenschaft in einigen Studien angezweifelt wurde[105], sollte man diese Möglichkeit durch den ständig wachsenden Erkenntnisstand auf diesem Gebiet nicht außer Acht lassen.

In weiteren differenzierteren Untersuchungen gilt es, die möglichen Applikationsarten und -wege, sowie die therapeutisch günstigsten Dosierungsmengen und -intervalle zu bestimmen, um diversen, bereits bekannten sowie noch potenziellen Nebenwirkungen entgegen zu wirken und zu verhindern.

#### **4.5.6 Nebenwirkungen des FGF19**

Trotz des großen, vorteilhaften Potenzials, das FGF19 zu bieten scheint, darf bei einer kritischen Betrachtung nicht unberücksichtigt bleiben, dass durchaus auch negative Effekte nachgewiesen werden konnten, die nach einer noch eingehenderen Auseinandersetzung verlangen.

Über die physiologische Funktionsweise der FGF19-FGFR4-Achse und deren regulatorischer Bedeutung wurde bereits oben ausführlich berichtet. In mehreren unterschiedlichen Studien konnten allerdings auch schon pathologische Komponenten im Zusammenhang mit dieser Verbindung, vor allem ihrer genetischen Expression, identifiziert werden.

Exemplarisch soll hier bündig auf das Heptaozelluläre Karzinom (HCC) eingegangen werden. In ihren transgenetischen Mäusemodellen konnten Nicholes et al. 2002 den Nachweis erbringen, dass eine Überexpression von FGF19 in deren Skelettmuskulatur zu Leberdysplasie und einer erhöhten Rate an HCCs führten. Weitere Unterstützung erfährt diese Argumentation, bei der Betrachtung der humanen Tumorgenese des HCC. Eine Schlüsselrolle hierbei scheint das Cyclin D1 (CCND1) einzunehmen, zu dessen Genamplifikation es in 15% der HCCs kommt. Zusätzlich konnte in diesen Fällen stets eine Co-amplifikation des FGF19-Gens nachgewiesen werden, welche einen engen Zusammenhang vermuten lässt [107, 108].

In diversen anderen Studien konnten demonstriert und beobachtet werden, welche Auswirkungen die Überexpression, Mutation oder Translokation der FGF-Rezeptoren haben können. Klare Beziehungen mit einer Vielzahl unterschiedlichster Karzinome konnten erbracht werden, die die verschiedensten Organe/Areale betreffen. Einige Beispiele hierfür sind das Blasen-CA, Pankreas-CA, Magen und Darmtumore oder auch Brustkrebs und das Multiple Myelom [109-117].

Diese verifizierten Tatsachen sollten stets in der zukünftigen FGF19 Forschung und bei den Versuchen eines therapeutischen Ansatzes Berücksichtigung finden.

## 5           **Ausblick**

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass die bereits gewonnenen Einblicke in die FGF19-Physiologie und dessen Bedeutung für den menschlichen Organismus und Metabolismus zum besseren Verständnis zahlreicher Pathologien und Prozesse beigetragen haben. Durch die unterschiedlichen Rollen und Funktionen, die sich bei seiner Erforschung bereits zeigten, wird es auch in Zukunft im Fokus zahlreicher wissenschaftlicher Fachbereiche sowie im allgemeinen Interesse übergreifender Disziplinen stehen.

Die Wichtigkeit und Bedeutung des FGF19 und der gesamten Familie der FGFGs konnte bereits in zahlreichen Forschungsarbeiten belegt werden und ihr weitreichender Einfluss auf den menschlichen Metabolismus erschließt sich zunehmend der wissenschaftlichen Einsicht. Diese Studie zeigt zum ersten Mal, dass Vitamin A ein potenter Regulator des FGF19 in humanen Darmzellen ist. In Anbetracht der oben erwähnten Daten und neuerlichen Erkenntnissen deuten unsere Ergebnisse auf einen möglichen therapeutischen Gebrauch des Vitamin A zur Korrektur pathologischer FGF19 Level in unterschiedlichen Stoffwechselstörungen hin und verlangen weitere klinischen Studien in die präsentierte Thematik.

## 6 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Materialien, Zusätze und Kits .....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 2: Verwendete Geräte.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 3: Untersuchte Zellreihen.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 4: Liste der für die PCR-Untersuchungen verwendeten Primer .....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 5: Kultur- und Zuchtmedien .....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 6: stimulatorische Zusätze .....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 7: Rezepturen der Blot-Gele .....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 8: Rezepturen der Puffer .....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 9: Rezeptur des Probenpuffers.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 10: Rezeptur des PCR Master Mix .....</i>	<i>32</i>

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1: Vergleichsreihe Caco-2 und HT-29 und deren Targetexpressionen unter Basalbedingungen.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 2: Konzentrationsabhängiger Einfluss von NR-Agonisten auf die FGF19-Expression in HT-29 Zellen;.....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 3: Zeitreihenversuch mit 50nM 1,25 (OH)<sup>2</sup> Vitamin D<sub>3</sub>; .....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 4: FGF19 Induktion durch die beiden NR-Agonisten CDCA und 9-cis RA;.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 5: Verlauf der Expressionssteigerung von FGF19 durch eine CDCA/RA-Mischung;.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 6: Wirkung der NR-Agonisten CDCA und 9-cis RA auf die FXR-Expression;.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 7: Vergleichsreihe der FXR-Expressionssteigerung durch drei unterschiedliche Zusätze und deren zeitlicher Verlauf; .....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 8: Expression des FXR Proteins nach 8 h. ....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 9: Expression des FXR-Proteins nach 24 h Inkubation mit NR-Agonisten .....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 10: Gezielte Expressionssteigerung von FGF19 durch TTNPB:.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 11: Anteil des RXR an der Expressionssteigerung des FXR .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 12: Spezifische Mechanismen der Vitamin A regulierten Expression von FGF19 und Fgf15.....</i>	<i>65</i>

## 8

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ASBT</b>	Apical Sodium dependent Bilesalt Transport
<b>BAD</b>	bile acid diarrhoea
<b>BGP</b>	Bone-Gla protein
<b>CDCA</b>	chenodeoxycholic acid
<b>CERB</b>	cAMP regulatory element-binding protein
<b>ChiP-seq</b>	Chromatin Immunopräzipitation Sequenzierung
<b>CYP</b>	Cytochrom P450
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid
<b>ERK</b>	Extracellular-signal Regulated Kinases
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth factor
<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth factor receptor
<b>FHF</b>	Fibroblast Homologous factor
<b>FXR</b>	Farnesoid X receptor
<b>HFD</b>	high fat diet
<b>IGF-1</b>	Insulin-like Growthfactor-1
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminalen Kinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LRH-1</b>	liver receptor homolog-1
<b>LXR</b>	liver X receptor
<b>MAP-Kinase</b>	Mitogen-activated protein Kinase
<b>NAFLD</b>	non alcoholic fatty liver disease
<b>NR</b>	nuclear receptors
<b>ONR</b>	orphan nuclear receptor
<b>PPAR</b>	peroxisome proliferator activated receptor
<b>RANKL</b>	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
<b>RAR</b>	Retinoid A receptor
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>rtPCR</b>	real time Polymerase chain reaction
<b>RXR</b>	Retinoid X receptor
<b>SHP</b>	small heterodimer partner
<b>SPP1</b>	Sekreted Phosphoprotein-1
<b>TRPV6</b>	Transient receptor potential cation channel, member 6
<b>VD3</b>	Cholecalciferol
<b>VDR</b>	Vitamin D receptor

## 9 Quellenverzeichnis

1. Trowell, O.A. and E.N. Willmer, *Studies on the growth of tissues in vitro. VI. The effects of some tissue extracts on the growth of periosteal fibroblasts.* Jour Exp Biol, 1939. **16**((1)): p. 60-70.
2. Hoffman, R.S., *The growth-activating effect of extracts of adult and embryonic tissues of rat on fibroblast colonies in vitro.* Growth, 1940. **4**((4)): p. 361-376.
3. Foley, J.F., B.J. Kennedy, and J.D. Ross, *A factor from HeLa cells promoting colonial growth of human fibroblast-like cells in culture.* Cancer Res, 1963. **23**: p. 368-71.
4. Gospodarowicz, D., K.L. Jones, and G. Sato, *Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(6): p. 2295-9.
5. Armelin, H.A., *Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(9): p. 2702-6.
6. Itoh, N., *Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease.* Cell Tissue Res, 2010. **342**(1): p. 1-11.
7. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors.* Genome Biol, 2001. **2**(3): p. REVIEWS3005.
8. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Evolution of the Fgf and Fgfr gene families.* Trends Genet, 2004. **20**(11): p. 563-9.
9. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy.* Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(3): p. 235-53.
10. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and O.A. Ibrahimi, *Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 107-37.
11. Goldfarb, M., *Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 215-20.
12. Tomlinson, E., et al., *Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity.* Endocrinology, 2002. **143**(5): p. 1741-7.
13. Fu, L., et al., *Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes.* Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2594-603.
14. Xie, M.H., et al., *FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4.* Cytokine, 1999. **11**(10): p. 729-35.
15. Nishimura, T., et al., *Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1444**(1): p. 148-51.

16. Long, Y.C. and A. Kharitonov, *Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(7): p. 791-5.
17. Potthoff, M.J., S.A. Kliewer, and D.J. Mangelsdorf, *Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine*. Genes Dev, 2012. **26**(4): p. 312-24.
18. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The structural biology of the FGF19 subfamily*. Adv Exp Med Biol, 2012. **728**: p. 1-24.
19. Johnson, D.E., et al., *The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(9): p. 4627-34.
20. Miki, T., et al., *Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 246-50.
21. Yu, C., et al., *Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15482-9.
22. Kurosu, H., et al., *Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6120-3.
23. Urakawa, I., et al., *Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 770-4.
24. Kharitonov, A., et al., *FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho*. J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 1-7.
25. Ito, S., et al., *Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein*. Mech Dev, 2000. **98**(1-2): p. 115-9.
26. Kuro-o, M., et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 45-51.
27. Fon Tacer, K., et al., *Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(10): p. 2050-64.
28. Kurosu, H., et al., *Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 26687-95.
29. Chiang, J.Y., *Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms*. J Hepatol, 2004. **40**(3): p. 539-51.
30. Zhang, Y., H.R. Kast-Woelbern, and P.A. Edwards, *Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 104-10.
31. Baptissart, M., et al., *Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling?* Cell Mol Life Sci, 2013.

32. Li, Y.C., D.P. Wang, and J.Y. Chiang, *Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase in the liver. Cloning, sequencing, and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA*. J Biol Chem, 1990. **265**(20): p. 12012-9.
33. Jelinek, D.F., et al., *Cloning and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis*. J Biol Chem, 1990. **265**(14): p. 8190-7.
34. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-5.
35. Parks, D.J., et al., *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1365-8.
36. Zhu, Y., F. Li, and G.L. Guo, *Tissue-specific function of farnesoid X receptor in liver and intestine*. Pharmacol Res, 2011. **63**(4): p. 259-65.
37. Hollman, D.A.A., et al., *Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: Insights into molecular mechanisms*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2012. **1821**(11): p. 1443-1452.
38. Wang, S., et al., *The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone*. Endocrinology, 2006. **147**(9): p. 4025-33.
39. Matsubara, T., F. Li, and F.J. Gonzalez, *FXR signaling in the enterohepatic system*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **368**(1-2): p. 17-29.
40. Lu, T.T., et al., *Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 507-15.
41. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 517-26.
42. Kerr, T.A., et al., *Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis*. Dev Cell, 2002. **2**(6): p. 713-20.
43. Wang, L., et al., *Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production*. Dev Cell, 2002. **2**(6): p. 721-31.
44. Boulias, K., et al., *Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP*. EMBO J, 2005. **24**(14): p. 2624-33.
45. Inagaki, T., et al., *Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis*. Cell Metab, 2005. **2**(4): p. 217-25.
46. Lundasen, T., et al., *Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man*. J Intern Med, 2006. **260**(6): p. 530-6.
47. Maloney, P.R., et al., *Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR*. J Med Chem, 2000. **43**(16): p. 2971-4.

48. Holt, J.A., et al., *Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis*. Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1581-91.
49. Choi, M., et al., *Identification of a hormonal basis for gallbladder filling*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1253-5.
50. Pournaras, D.J., et al., *The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control*. Endocrinology, 2012. **153**(8): p. 3613-9.
51. Cicione, C., C. Degirolamo, and A. Moschetta, *Emerging role of fibroblast growth factors 15/19 and 21 as metabolic integrators in the liver*. Hepatology, 2012. **56**(6): p. 2404-11.
52. Marcelin, G., et al., *Central action of FGF19 reduces hypothalamic AGRP/NPY neuron activity and improves glucose metabolism*. Mol Metab, 2014. **3**(1): p. 19-28.
53. Potthoff, M.J., et al., *FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1alpha pathway*. Cell Metab, 2011. **13**(6): p. 729-38.
54. Postic, C. and J. Girard, *The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis*. Diabetes Metab, 2008. **34**(6 Pt 2): p. 643-8.
55. Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 507-20.
56. Bhatnagar, S., H.A. Damron, and F.B. Hillgartner, *Fibroblast growth factor-19, a novel factor that inhibits hepatic fatty acid synthesis*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 10023-33.
57. Hong, S.H., et al., *Nuclear receptors and metabolism: from feast to famine*. Diabetologia, 2014. **57**(5): p. 860-7.
58. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
59. Chawla, A., et al., *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-70.
60. King-Jones, K. and C.S. Thummel, *Nuclear receptors--a perspective from Drosophila*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(4): p. 311-23.
61. Imai, Y., et al., *Nuclear receptors in bone physiology and diseases*. Physiol Rev, 2013. **93**(2): p. 481-523.
62. Giguere, V., *Orphan nuclear receptors: from gene to function*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 689-725.
63. Pascual, G., et al., *A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma*. Nature, 2005. **437**(7059): p. 759-63.

64. Ghisletti, S., et al., *Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 57-70.
65. Hollman, D.A., et al., *Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: insights into molecular mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(11): p. 1443-52.
66. Burris, T.P., et al., *Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(2): p. 710-78.
67. Cheng, S.Y., J.L. Leonard, and P.J. Davis, *Molecular aspects of thyroid hormone actions*. Endocr Rev, 2010. **31**(2): p. 139-70.
68. Mangelsdorf, D.J. and R.M. Evans, *The RXR heterodimers and orphan receptors*. Cell, 1995. **83**(6): p. 841-50.
69. Morris, H.A., *Vitamin D Activities for Health Outcomes*. Ann Lab Med, 2014. **34**(3): p. 181-186.
70. Holick, M.F., *McCullum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century*. Am J Clin Nutr, 1994. **60**(4): p. 619-30.
71. Bischoff-Ferrari, H.A., et al., *A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention*. N Engl J Med, 2012. **367**(1): p. 40-9.
72. Ringe, J.D., *The effect of Vitamin D on falls and fractures*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2012. **243**: p. 73-8.
73. Carlberg, C., *Genome-wide (over)view on the actions of vitamin D*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 167.
74. Haussler, M.R., et al., *The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the "Fountain of Youth" to mediate healthful aging*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 88-97.
75. Schmidt, D.R., et al., *Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14486-94.
76. Prufer, K., et al., *Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41114-23.
77. Yu, V.C., et al., *RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1251-66.
78. Sutton, A.L. and P.N. MacDonald, *Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(5): p. 777-91.
79. Goodman, D.S., *Vitamin A and retinoids in health and disease*. N Engl J Med, 1984. **310**(16): p. 1023-31.
80. Napoli, J.L., *Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **80**(3 Pt 2): p. S52-62.

81. Carta, G., et al., *Metabolic Interactions between vitamin A and conjugated linoleic acid*. *Nutrients*, 2014. **6**(3): p. 1262-72.
82. Vogel, S.G., M.V.; Blaner, W.S.;, *Biosynthesis, Absorption, Metabolism and Transport of Retinoids.*, in *In Retinoids -The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, H. Nau, Blaner, W.S., Editor. 1999, Springer Verlag Publishing: Heidelberg, Germany. p. 31-95.
83. Nohara, A., J. Kobayashi, and H. Mabuchi, *Retinoid X receptor heterodimer variants and cardiovascular risk factors*. *J Atheroscler Thromb*, 2009. **16**(4): p. 303-18.
84. Al Tanoury, Z., A. Piskunov, and C. Rochette-Egly, *Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(7): p. 1761-75.
85. Germain, P., et al., *International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(4): p. 760-72.
86. Germain, P., et al., *International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(4): p. 712-25.
87. Mangelsdorf, D.J., et al., *A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR*. *Cell*, 1991. **66**(3): p. 555-61.
88. Mader, S., et al., *The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains*. *EMBO J*, 1993. **12**(13): p. 5029-41.
89. Vandewalle, B., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues*. *Cancer Lett*, 1994. **86**(1): p. 67-73.
90. Matusiak, D., et al., *Expression of vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D3-1{alpha}-hydroxylase in normal and malignant human colon*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(10): p. 2370-6.
91. Lefebvre, P., et al., *Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(1): p. 147-91.
92. Vlahcevic, Z.R., *Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by different effectors*. *Ital J Gastroenterol*, 1996. **28**(6): p. 337-9.
93. Hylemon, P.B., R.T. Stravitz, and Z.R. Vlahcevic, *Molecular genetics and regulation of bile acid biosynthesis*. *Prog Liver Dis*, 1994. **12**: p. 99-120.
94. Camilleri, M., *Advances in understanding of bile acid diarrhea*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **8**(1): p. 49-61.
95. Walters, J.R., et al., *The response of patients with bile acid diarrhoea to the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014.
96. Li, J., et al., *Regulation of complement C3 expression by the bile acid receptor FXR*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(9): p. 7427-34.

97. Miyata, M., et al., *Involvement of multiple elements in FXR-mediated transcriptional activation of FGF19*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **132**(1-2): p. 41-7.
98. Ervin, R.B. and National Center for Health Statistics (U.S.), *Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index : United States, 2003-2006*. National health statistics reports. 2009, Hyattsville, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. 8 p.
99. Stejskal, D., et al., *Fibroblast growth factor-19: development, analytical characterization and clinical evaluation of a new ELISA test*. Scand J Clin Lab Invest, 2008. **68**(6): p. 501-7.
100. Naslund, E., et al., *Gastrointestinal hormones and gastric emptying 20 years after jejunioileal bypass for massive obesity*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1997. **21**(5): p. 387-92.
101. Haluzikova, D., et al., *Laparoscopic sleeve gastrectomy differentially affects serum concentrations of FGF-19 and FGF-21 in morbidly obese subjects*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(7): p. 1335-42.
102. Jansen, P.L., et al., *Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery*. Dig Dis, 2011. **29**(1): p. 48-51.
103. Gerhard, G.S., et al., *A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass*. Diabetes Care, 2013. **36**(7): p. 1859-64.
104. Brunt, E.M., *Pathology of nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(4): p. 195-203.
105. Eren, F., et al., *Preliminary evidence of a reduced serum level of fibroblast growth factor 19 in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Biochem, 2012. **45**(9): p. 655-8.
106. Alisi, A., et al., *Association between Serum Atypical Fibroblast Growth Factors 21 and 19 and Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67160.
107. Sawey, E.T., et al., *Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening*. Cancer Cell, 2011. **19**(3): p. 347-58.
108. Zhou, M., et al., *Separating Tumorigenicity from Bile Acid Regulatory Activity for Endocrine Hormone FGF19*. Cancer Res, 2014. **74**(12): p. 3306-16.
109. Bange, J., et al., *Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 840-7.
110. Cappellen, D., et al., *Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 18-20.

111. Chesi, M., et al., *Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma*. *Blood*, 2001. **97**(3): p. 729-36.
112. Chesi, M., et al., *Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3*. *Nat Genet*, 1997. **16**(3): p. 260-4.
113. Gowardhan, B., et al., *Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(2): p. 320-7.
114. Jaakkola, S., et al., *Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers*. *Int J Cancer*, 1993. **54**(3): p. 378-82.
115. Jang, J.H., K.H. Shin, and J.G. Park, *Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers*. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3541-3.
116. Jang, J.H., et al., *Novel transcripts of fibroblast growth factor receptor 3 reveal aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4049-52.
117. Jeffers, M., W.J. LaRochelle, and H.S. Lichenstein, *Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities*. *Expert Opin Ther Targets*, 2002. **6**(4): p. 469-82.

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof Dr. Andreas Geier danken, der es mir nach zuerst langer Suche ermöglichte, eine Doktorarbeit zu verfassen und Teil eines wissenschaftlichen Teams zu werden. Die dort gesammelten Erfahrungen waren eine echte Bereicherung meiner akademischen Ausbildung.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. Daniel Jahn, der mich in allen Fragestellungen und in der Gestaltung dieser Arbeit, von Beginn an betreut und gefördert hat. Vielen Dank für ihr herausragendes Engagement

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Hepatologie danken, ohne deren Geduld und methodischer Hilfestellung diese Dissertation nur schwerlich zustande gekommen wäre.

Frau Prof. Dr. Antje Gohla vom Institut für Pharmakologie und Rudolf-Virchow-Zentrum möchte ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferats danken.