

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Bedeutung von AKR1B7 für die Gallensäurenentgiftung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Samuel Schmidt

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.12.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem. Jörg Heeren**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Prof. Dr. med. Udo Schumacher, FRCPATH CBiol FRSB DSc**

In memory of my dear grandparents...

<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1 Gallensäuren	1
1.1.1 Bedeutung der Gallensäuren	1
1.1.2 Enterohepatischer Kreislauf	2
1.1.3 Gallensäurensynthese	4
1.1.4 Regulation der Gallensäuren-Homöostase	8
1.1.5 Pathophysiologie der Gallensäuren	12
1.2 AKR1B7	16
1.3 Ziel der Arbeit	19
 <u>2. Material und Methoden</u>	 <u>20</u>
2.1 Präparation der Gewebeproben	20
2.2 RNA-Isolierung	20
2.3 Reverse Transkription (RT)	22
2.4 PCR	22
2.4.1 Primer	22
2.4.2 PCR Reaktionsansatz	25
2.4.3 PCR Programm	26
2.4.4 Gelelektrophorese	26
2.4.5 Sequenzierung	27
2.4.6 Aufreinigung von DNA	27
2.4.7 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmungen	27
2.5 Klonierung	28
2.5.1 Plasmid Vektoren	28
2.5.2 Inserts	28
2.5.3 Restriktionsenzymverdau	29
2.5.4 Aufreinigung von DNA	29
2.5.5 Ligation	30
2.5.6 Transformation	30
2.5.7 Animpfen einer Schüttelkultur für Plasmidpräparation	31
2.5.8 Mini-Plasmidpräparation	31

2.6 Zellkultur	32
2.6.1 Zellaufzucht und –passagierung	32
2.6.2 Transfektion	32
2.7 Proteinbiochemie	33
2.7.1 Zellernte	33
2.7.2 Proteinbestimmung nach Lowry	33
2.7.3 Western Blot	34
2.8 Gallensäurenbehandlung und –extraktion	36
2.9 HPLC/MS-Detektion	36
 3. Ergebnisse	 38
3.1 Klonierung Akr1b7 und CRAD2 tragender Plasmide	38
3.1.1 Insert-Herstellung: Amplifikation muriner Akr1b7 und Crad2	38
3.1.2 Restriktionsenzymverdau von Akr1b7 und Crad2 tragende Inserts, pCMX und p3XFLAG	39
3.1.3 Ligation von Akr1b7 und Crad2 mit pCMX und p3XFLAG	39
3.1.4 Transformation Akr1b7 und Crad2 tragender Plasmide in DH5alpha Zellen	39
3.1.5 Überprüfung der Klone pCMX-Akr1b7, p3XFLAG-Akr1b7, pCMX-Crad2 und p3XFLAG-Crad2	40
3.2 Überprüfen des Proteinexpressions-Assays	44
3.3 LC/MS-Analyse des Kulturmediums Gallensäure-behandelter Akr1b7-exprimierender HEK293 Zellen	46
3.3.1 Substrate der AKR1B7	46
3.3.2 Nicht umgesetzte Substrate der AKR1B7	56
 4. Diskussion	 63
4.1 Bedeutung von AKR1B7	63
4.2 Stoffwechsel von Gallensäuren durch AKR1B7	63
4.3 Bedeutung der Prozessierung von Gallensäuren durch AKR1B7	64
4.4 Ausblick	70

<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>71</u>
<u>6. Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>72</u>
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>74</u>
<u>8. Danksagung</u>	<u>85</u>
<u>9. Eidesstattliche Erklärung</u>	<u>86</u>

1. Einleitung

1.1 Gallensäuren

1.1.1 Bedeutung der Gallensäuren

Galle wird von den Hepatozyten in die Gallengänge sezerniert, und besteht aus Gallensäuren, Cholesterin, Phosphatidylcholin, und Billirubin. Durch ihre amphipathischen Eigenschaften sind Gallensäuren als Emulgator für die intestinale Resorption der Nahrungslipide und der fettlöslichen Vitamine essentiell, und stellen eine entscheidende physiologische Kraft für die Aufrechterhaltung des Galleflusses dar.

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil tierischer Membranen und Vorläufer für Hormone, kann aber in hohen Konzentrationen für tierische Zellen toxisch sein. Überschüssiges Cholesterin kann nur in der Leber abgebaut und letztendlich in Gallensäuren umgewandelt werden. Durch Konvertierung in wasserlösliche Gallensäuren und anschließender biliärer Exkretion sind Säugetiere somit in der Lage Cholesterin auszuscheiden (Cheng und Russel 2003).

Der Gallensäuren-Stoffwechsel wird durch Gallensäuren selbst reguliert, die als Signalmoleküle an nukleäre Rezeptoren und Membranrezeptoren binden. So werden nicht nur der Cholesterin- und Gallensäurenstoffwechsel sondern auch andere zelluläre Signalfade aktiviert, die den Lipid-, Glukose-, und Energiemetabolismus regulieren (Chiang 2009, Houten 2006). Während der Gallensäuren-bindende nukleäre Farnesoid-X-Rezeptor die Lipidhomöostase reguliert, führt der Gallensäuren-aktivierte Membranrezeptor TGR5 im braunen Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT) und in Muskelzellen zur Steigerung des Energiehaushalts und der Wärmeproduktion (Thomas et al. 2008). Gallensäuren sind Signale der Nahrungsmittelverfügbarkeit, weil deren Serumspiegel nach Nahrungseinnahme im Serum ansteigt (Thomas et al. 2008a). Auch einige pro-inflammatorische Zytokine werden von Gallensäuren stimuliert, unter anderem das „tumor necrosis factor“ (TNF α). Gallensäuren haben eine Funktion bei der Zelldifferenzierung, so begünstigen sie unter anderem das *browning*, einem Prozess bei dem thermogene, sogenannte beige Adipozyten im weißem Fettgewebe entstehen (Heeren und Münzberg 2013).

1.1.2 Enterohepatischer Kreislauf

Die menschliche Leber synthetisiert täglich 0,2-0,6 g (durchschnittlich 0,5 g) Gallensäuren. Wie in Abbildung 1 dargestellt, werden diese primären, konjugierten Gallensäuren durch das Transportenzym „bile salt export pump“ (BSEP), das in der Membran der Gallengänge lokalisiert ist, in die Gallengänge sezerniert. Die Gallensäuren gelangen über die Gallenwege in die Gallenblase, wo sie vor der Abgabe gespeichert werden. Nach jeder Mahlzeit kommt es durch Gallenblasenkontraktion zur Gallensäurenentleerung ins Lumen des Zwölffingerdarms. Beim Durchlauf durch das Intestinum kommt es zur Rückresorption von Gallensäuren aus dem Lumen des Darms in die Enterozyten.

Der Hauptanteil der Gallensäuren-Rückresorption erfolgt durch aktiven Transport konjugierter Gallensäuren über den apikalen natriumabhängigen Transporter „apical sodium-dependent bile acid transporter“ (ASBT), der sich in der Membran des terminal-ilealen Bürstensaums befindet (Hofmann et al. 2009, Chiang 2009). Über den Natrium-abhängigen „organic solute transporter α and β heterodimer“ (OST α / OST β) der basolateralen Membran verlassen Gallensäuren die Enterozyten durch aktiven Transport in den portalvenösen Kreislauf, und gelangen wiederum durch das „Na⁺ dependent taurocholate cotransport peptide“ (NTCP), das sich in der Lebersinusmembran befindet, durch aktiven Transport in die Hepatozyten. (Chiang 2009) Ein geringer Teil der Gallensäuren wird im Intestinum durch passive Diffusion unkonjugierter Gallensäuren rückresorbiert und gelangt auch über den Portalkreislauf in die Hepatozyten. Der enterohepatische Kreislauf schließt sich, indem Gallensäuren von den Hepatozyten wieder in die Gallengänge sezerniert werden.

Die Gesamtmenge des Gallensäurepools, etwa 3 g, zirkuliert im enterohepatischen Kreislauf vier- bis zwölfmal täglich. Dabei wird etwa 95% des Gallensäurepools bei jedem Durchlauf im Darm rückresorbiert. CA, CDCA und DCA bilden den Hauptanteil der rückresorbierten Gallensäuren; LCA wird größtenteils ausgeschieden. Die geringe Menge der extrem hydrophoben LCA die wieder in die Leber gelangt wird durch die Sulfotransferase2a1 (SULT2A1) zur Detoxifikation sulfokonjugiert und in die Galle sezerniert. Der aus dem Darm nicht-rückresorbierte Anteil des Gallensäurepools entspricht dem Verlust mit dem Stuhl. Dieser Verlust wird durch eine entsprechende Menge de-novo Synthese in der Leber kompensiert, um die Menge des Gallensäurepools konstant zu halten. (Chiang 2009)

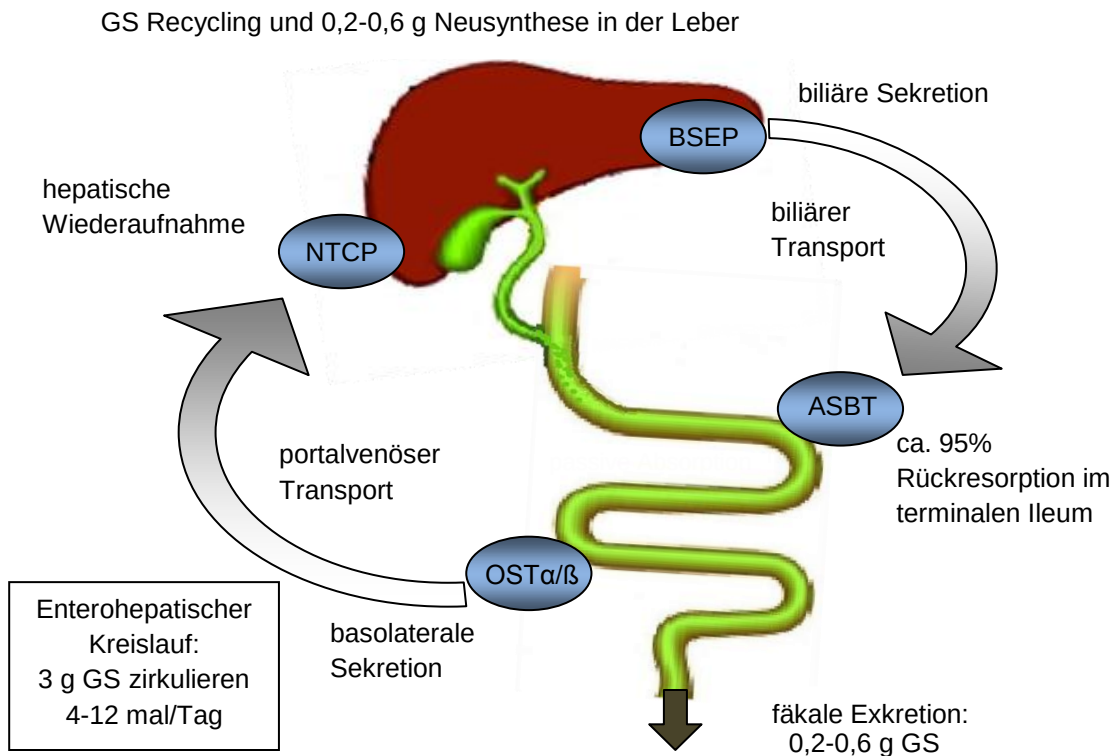


Abbildung 1: Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren (GS). Die menschliche Leber synthetisiert täglich 0,2-0,6 g Gallensäuren neu. Gallensäuren werden durch den BSEP in die Gallengänge sezerniert und gelangen postprandial durch biliären Transport ins Duodenum. Gallensäuren werden hauptsächlich aktiv durch den ASBT, der sich in der Membran des terminal-ilealen Bürstensaums befindet, rückresorbiert. Über die Natrium-abhängigen OSTα und OSTβ der basolateralen Membran, verlassen Gallensäuren die terminal-ilealen Enterozyten durch aktiven Transport in den portalvenösen Kreislauf und gelangen durch NTCP in die Hepatozyten.

Bei steigenden Gallensäurenkonzentrationen in den Hepatozyten gelangen Gallensäuren über die Lebersinus in den systemischen Kreislauf, wo sie ihre Funktionen außerhalb des Verdauungsystems wahrnehmen. Gallensäuren die im Nierentubulus filtriert wurden, werden rückresorbiert und gelangen durch den systemischen Kreislauf über die Leberarterien in die Hepatozyten. Im cholangiohepatischen Shunt werden einige Gallensäuren von den Cholangiozyten der Gallenwege rückresorbiert und gelangen auch wieder in die Hepatozyten.

1.1.3 Gallensäurensynthese

Die etwa 500 mg Cholesterin, die täglich von der erwachsenen menschlichen Leber in Gallensäuren konvertiert werden, entsprechen etwa 90 % des vom Körper aktiv metabolisierten Cholesterins, während der restliche Anteil bei der Steroidhormonsynthese metabolisiert wird.

An der Synthese primärer Gallensäuren sind 11 bis 17 verschiedene Enzyme der klassischen und alternativen Biosynthesepfade beteiligt (siehe Abbildung 2). Viele dieser Enzyme werden vorwiegend in der Leber, aber auch im Steroidhormon-produzierenden Gewebe exprimiert. Der größte Anteil dieser Enzyme gehört zur Superfamilie der Cytochrom P450 Enzyme (CYP) und zur Superfamilie der Aldoketoreduktasen (AKR). Nur in der Leber werden alle Enzyme exprimiert, die an der Synthese der beiden beim Menschen am häufigsten vorkommenden primären Gallensäuren, Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) beteiligt sind.

Bei der Synthese einer Gallensäure kommt es zunächst zur 7 α -Hydroxylierung eines Sterols, gefolgt von weiterer Modifikation der Ringstrukturen, Oxidation und Seitenkettenverkürzung und Aminokonjugation der Gallensäure. Im klassischen Synthesepfad wird Cholesterin direkt durch das im endoplasmatischen Retikulum (ER) befindliche CYP7A1 an der Position 7 α hydroxyliert. Weil circa 90 % der neusynthetisierten Gallensäuren im klassischen Gallensäurensynthesepfad synthetisiert werden und CYP7A1 den klassischen Gallensäurenbiosynthesepfad initiiert, ist dieses leberspezifische Enzym das wichtigste Schlüsselenzym der Gallensäurensynthese.

Circa 10% der menschlichen Gallensäuren werden in einem alternativen Pfad aus Oxysterolen synthetisiert, gegenüber ca. 25 % bei der Maus. Der alternative Pfad ist zum Abbau von Oxysterolen wichtig, die ansonsten akkumulieren und die Gallensäurensynthese im klassischen Pfad blockieren. Der klassische und der alternative Gallensäurensynthesepfad haben eine gemeinsame Endstrecke in der Leber; das Produkt dieser Synthesewege wird als primäre Gallensäure bezeichnet. Im alternativen Pfad entstehen zunächst 7 α -hydroxylierte Oxysterole aus Cholesterin durch die Zusammenwirkung jeweils zweier Enzyme, Cholesterin 24-Hydroxylase (CYP46A1) und Oxysterol 7 α -Hydroxylase (CYP39A1), oder Cholesterin 25-Hydroxylase (CH25H) bzw. Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1), zusammen mit der Oxysterol 7 α -Hydroxylase (CYP7B1).

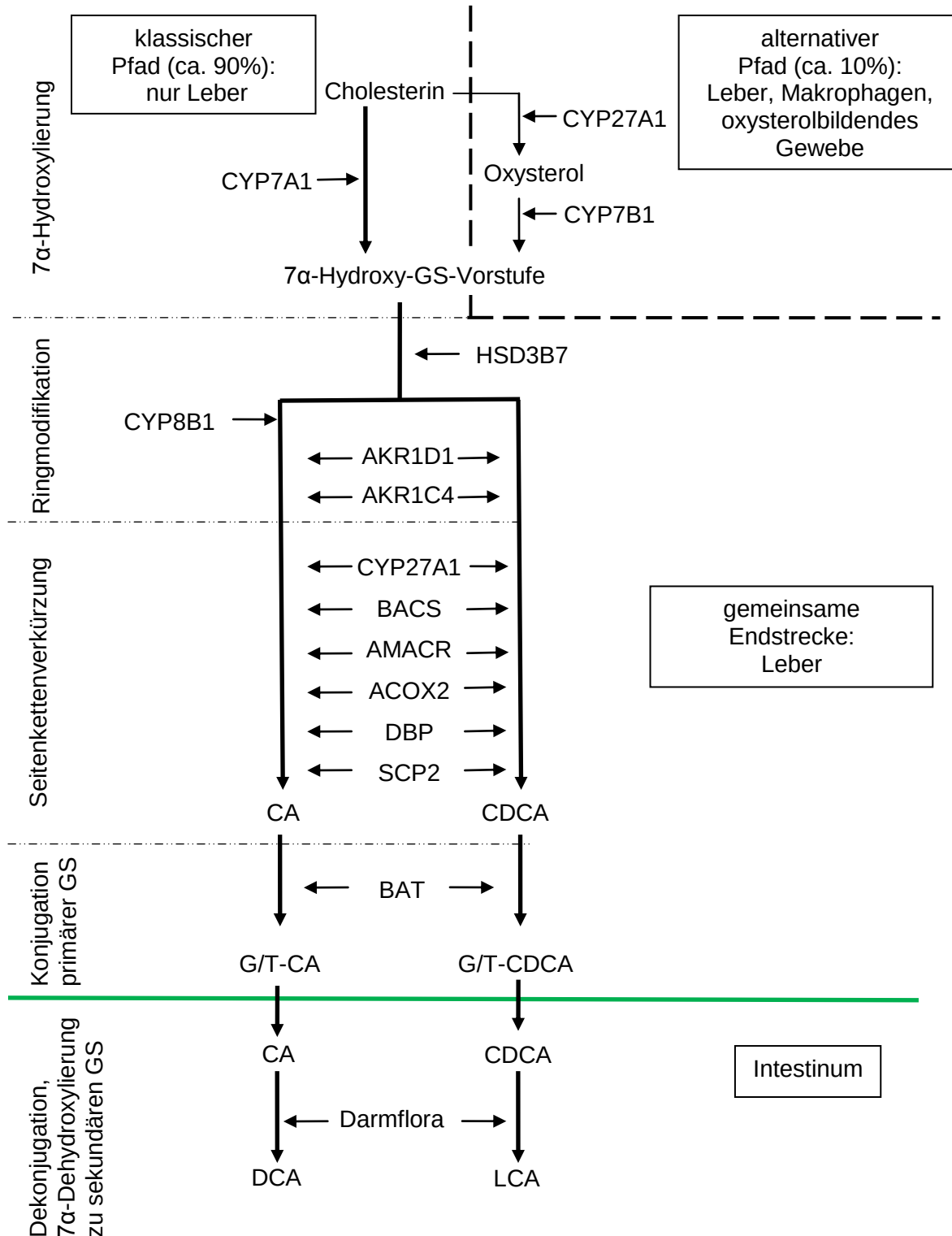


Abb. 2: Synthese primärer und sekundärer Gallensäuren. Ca. 90 % der humanen Gallensäuren (GS) werden im klassischen Pfad und ca. 10 % im alternativen Pfad synthetisiert. Der klassische Pfad befindet sich in der Leber, der alternative Pfad beginnt in der Leber, in Makrophagen und Oxysterol-bildenden Geweben und endet in der Leber.

Der klassische Pfad wird initiiert indem CYP7A1 Cholesterin 7 α -hydroxyliert. Im alternativen Pfad wird Cholesterin von CYP27A1 zum Oxysterol 27-Hydroxycholesterin hydroxyliert und dieses von CYP7B1 7 α -hydroxyliert. Ringmodifikation und Seitenkettenverkürzung der Vorstufen und die Konjugation der GS erfolgt in der Leber. An der Ringmodifikation sind die Enzyme HSD3B7, AKR1D1, und AKR1C4 beteiligt, sowie CYP8B1 wenn Cholsäure (CA) synthetisiert wird. Die Seitenkettenverkürzung wird von den Enzymen CYP27A1, BACS, AMACR, ACOX2, DBP, und SCP2 katalysiert, wobei CA oder Chenodesoxycholsäure (CDCA) entstehen. Die BAT konjugiert diese Gallensäuren mit Glycin (G) oder Taurin (T). Glyco- bzw. Tauro-konjugierte CA (G/T-CA) bzw. CDCA (G/T-CDCA) werden ins Intestinum transportiert, wo Enzyme der bakteriellen Darmflora die sekundären Gallensäure DCA aus CA bzw. LCA aus CDCA synthetisiert. Die verwendeten Akronyme sind: CYP, Cytochrom P450 Enzym; AKR, Aldoketoreduktase; HSD3B7, 3 β -Hydroxy-delta⁵-C₂₇-Steroid Oxidoreduktase; BACS, Gallensäuren Coenzym A Ligase; AMACR, 2-Methylacyl-Coenzym A Racemase; ACOX2, „branched-chain acyl-coenzym A oxidase“; DBP, „D-bifunctional protein“; SCP2, Peroximale Thiolase 2; BAT, Gallensäuren Coenzym A: Aminosäure N-Acetyltransferase.

CYP46A1 wird viel höher im ER des Gehirns exprimiert als in der Leber. Jedoch wird angenommen, dass dieses Enzym viel bedeutender an dem Cholesterinmetabolismus im Gehirn beteiligt ist als an der Gallensäurensynthese. CH25H ist Mitglied einer Familie von Lipid-metabolisierenden Enzymen, die ein Dieisen als Kofakor verwenden. CH25H wird höher in der Lunge exprimiert als in anderen Geweben und es wird angenommen, dass es wie CYP46A1 eine gewebsspezifische Funktion beim Cholesterinkatabolismus außerhalb der Leber besitzt.

CYP27A1 ist ein mitochondriales Enzym, das in der Leber, in Makrophagen und in den meisten anderen Geweben vorkommt. Das der vom CYP27A1 initiierte Pfad der für den Gallensäurenmetabolismus bedeutendste der alternativen Pfade ist, wird nicht zuletzt von der Beobachtung unterstützt, dass 27-Hydroxycholesterin das im menschlichen Plasma am häufigsten vorkommende Oxysterol ist.

Die beiden mitochondrialen Enzyme CYP39A1 und CYP7B1 katalysieren die 7 α -Hydroxylierung der Oxysterole und sind im ER der Leber und von vielen anderen Geweben vorhanden. Bei der weiteren Modifikation der Ringstrukturen werden 7 α -hydroxylierte Zwischenprodukte der klassischen und alternative Pfade von der mikrosomalen 3 β -Hydroxy-delta⁵-C₂₇-Steroid Oxidoreduktase (HSD3B7) umgesetzt. Ohne HSD3B7 können keine Gallensäuren synthetisiert werden.

Wird das Produkt der Umsetzung durch HSD3B7 nachfolgend durch die leberspezifische mikrosomale Sterol 12 α -Hydroxylase CYP8B1 12 α -hydroxyliert, entsteht daraus Cholsäure nach weiteren Reaktionsschritten. Ohne diese 12 α -Hydroxylierung entsteht CDCA im weiteren Verlauf des Synthesewegs. Die zytoplasmatische Enzyme Aldoketoreduktase1d1 (AKR1D1) und Aldoketoreduktase1c4 (AKR1C4) schließen die Ringmodifikation der Gallensäurenzwischenprodukte ab.

Nachfolgend kommt es in mehreren Schritten zur Seitenkettenoxidation der Produkte der

Ringmodifikation durch die Wirkung der CYP2A7, die auch am Anfang des für die Gallensäurensynthese wichtigsten alternativen Pfads steht. Die von CYP2A7 oxidierten Gallensäurezwischenprodukte verlassen die Mitochondrien und werden in Peroxisomen transportiert, wo es zur Verkürzung der Seitenkette durch die Wirkung der Gallensäuren Coenzym A Ligase („bile acid CoA synthase“, BACS), der 2-Methylacyl-Coenzym A Racemase („alpha-methylacyl-CoA racemase“, AMACR), der „branched-chain acyl-coenzym A oxidase“ (ACOX2), der „D-bifunctional protein“ (DBP), und der Peroxisimalen Thiolase 2 (SCP2) kommt. Als Produkte entstehen C₂₄-Gallensäuren die im finalen Schritt der Synthese primärer Gallensäuren aminokonjugiert werden.

Die Aminokonjugation mit Glycin oder Taurin wird von der peroxisomalen Gallensäuren Coenzym A: Aminosäure N-Acetyltransferase („bile acid:amino acid transferase“, BAT) katalysiert. Die Gallensäurenkonjugation erhöht die Wasserlöslichkeit der Gallensäuren.

Die Wasserlöslichkeit schont die Zellmembran, die aufgrund der amphiphilen Eigenschaften der Gallensäuren anfällig ist, und BSEP transportiert die Gallensäuren über Zellmembrane in die Gallenwege (Russel 2003, Chiang 2009). Indem Gallensäuren aminokonjugiert werden, vermindert sich deren Toxizität während ihre Hydrophilizität steigt.

Im Intestinum werden glyco- und taurokonjugierte CA und CDCA von Bakterien dekonjugiert und dehydroxyliert (Kang et al. 2009), sodass sekundäre Gallensäuren entstehen, die eine höhere Toxizität aufweisen als die aus der Leber ins Intestinum transportierten primären Gallensäuren. Die 7 α -Dehydroxylase bakterieller Flora entfernt die 7 α -Hydroxygruppe von CA und CDCA, sodass sich die sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure (DCA) bzw. Lithocholsäure (LCA) ergeben. Nach Reabsorption im Intestinum werden CA, CDCA und DCA an die Leber zurücktransportiert, wo sie durch Rekonjugation und in einigen Fällen durch Rehydroxylierung recycelt werden (Chiang 2009). Im Darm der Maus wird CDCA zur Muricholsäure umgesetzt, von dem ein hoher Anteil β -konfigurierte Hydroxygruppen besitzt (Thomas et al. 2008), sodass CA und Muricholsäure den größten Anteil der murinen Gallensäuren bilden.

Auch mit steigendem Grad der Hydroxylierung steigt die Hydrophilizität der Gallensäuren und deren Toxizität nimmt ab. Neben der Aminokonjugation und der Anzahl der Hydroxygruppen sind auch die Position und Orientierung der Hydroxygruppen für die Gallensäurentoxizität relevant. Der Toxizität nach ergibt sich folgende Reihenfolge: CA < CDCA < DCA < LCA (Perez und Briz 2009, zur Struktur dieser Gallensäuren siehe Abbildung 3).

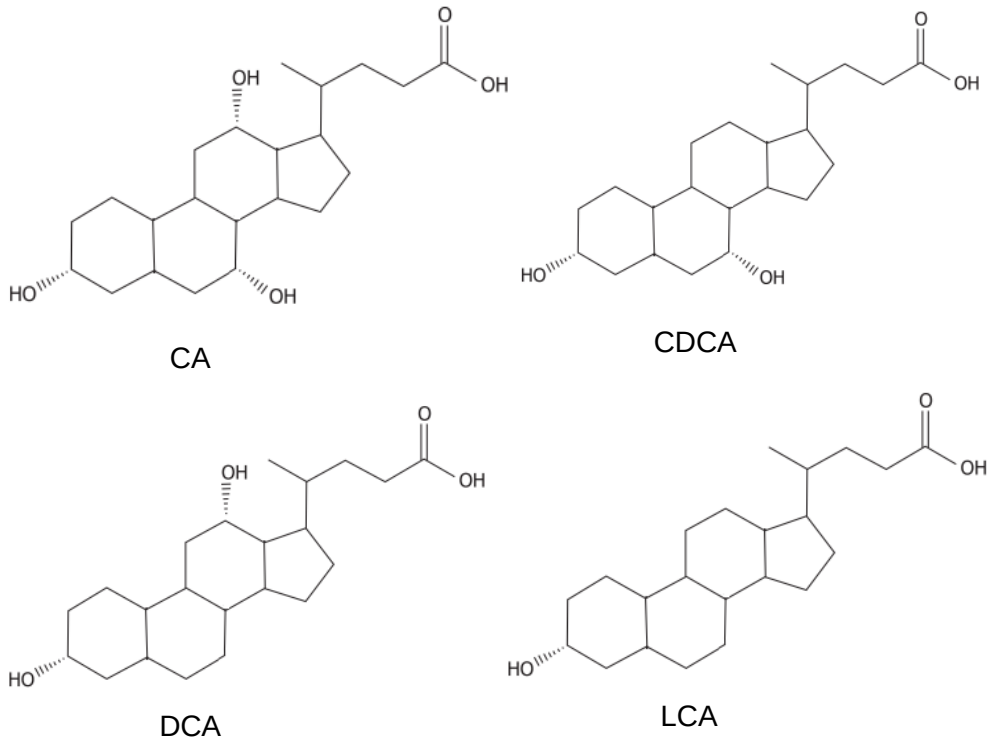


Abb. 3: Molekularstrukturen der beim Menschen am häufigsten vorkommenden Gallensäuren. Die 7 α -Hydroxygruppe der primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) wird von Darmbakterien entfernt, sodass die sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure (DCA) beziehungsweise Lithocholsäure (LCA) gebildet werden.

1.1.4 Regulation der Gallensäuren-Homöostase

Die Gallensäuren-Homöostase wird eng kontrolliert und genau reguliert, damit Gallensäuren ihre vielfältigen Funktionen wahrnehmen können, insbesondere damit eine ausreichende Emulgation von Nahrungslipiden gewährleistet ist und Cholesterin in ausreichender Menge katabolisiert wird.

Regulation der Gallensäurensynthese

Sind Gallensäuren im Körper in ausreichender Menge vorhanden, führen diese zur Inhibierung der weiteren Gallensäuresynthese, indem die Expression von CYP7A1 vermindert wird (Abbildung 4). Umgekehrt wird über CYP7A1 Induktion die Gallensäuresynthese erhöht, wenn die Menge der Gallensäuren im Organismus nicht

ausreicht. An der Regulierung der Genexpression der Enzyme der Gallensäurensynthese sind viele Rezeptoren beteiligt, die wie Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), „short heterodimeric partner“ (SHP), und „liver receptor homologue-1“ (LRH-1) zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren gehören.

Die FXR vermittelte negative Feedback-Regulierung der Gallensäurensynthese (Wang et al. 1999, Goodwin et al. 2000, Lu et al. 2000) erfolgt, indem Gallensäuren und auch FGF19 über die Portalvene in die Hepatozyten transportiert werden, wo sie die Gallensäurensynthese hemmen. Die Wirksamkeit der Gallensäuren als FXR-Liganden ist unterschiedlich, dabei ist CDCA der wirksamste FXR-Ligand (Chiang 2009, Schmidt et al. 2011).

FXR/SHP Pfad

In der Leber binden Gallensäuren an FXR, das daraufhin die Transkription von SHP aktiviert. SHP inhibiert über den „*hepatocyte nuclear factor 4α*“ (HNF4α) die Expression der CYP7A1 und CYP8B1 Gene. SHP blockiert die Interaktion zwischen HNF4α und dem „*peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha*“ (PGC-1α), sodass es zur Inhibition der CYP7A1 und CYP8B1 Genexpression kommt (Zhang et al. 2001, Del Castillo-Olivares 2004).

Im Vergleich zu HNF4α ist LRH-1 ein schwacher Transkriptionsfaktor (Chiang 2009), dessen Bindungsstelle die HNF4α Bindungsstelle im CYP7A1 Promotor teilweise deckt (Zhang et al. 2001, Del Castillo-Olivares 2004). Es wird in Frage gestellt, ob der FXR/SHP/LRH-1 Signalpfad unter physiologischen Bedingungen zur Inhibition der CYP7A1 Expression führt, aber eine Inhibition der CYB8B1 Genexpression über diesen Pfad wird weiterhin beschrieben (Mataki et al. 2007, Schmidt et al. 2008).

Über SHP Induktion inhibiert FXR die Genexpression von CYP7A1, CYB8B1 und CYP7B1, und induziert BAT (Boulias et al. 2005). FXR induziert auch BACS und SCP2. In dem durch FXR-Aktivierung Enzyme, die am Anfang der Gallensäurensynthesepfade vorkommen, inhibiert werden und die im Gallensäuresynthesepfad nachfolgende Enzyme induziert werden, wird die Gallensäurensynthese inhibiert und toxische Zwischenprodukte der Gallensäurensynthese werden abgebaut. Im gleichen Sinne führt FXR Aktivierung von SHP auch zur Induktion von BSEP, das Gallensäuren aus den Hepatozyten herauspumpt, und zur Inhibition der Induktion von NTCP, das Gallensäuren in die Hepatozyten hineinpumpt, sodass der Gallensäurenspiegel in den Hepatozyten sinkt (Boulias et al. 2005).

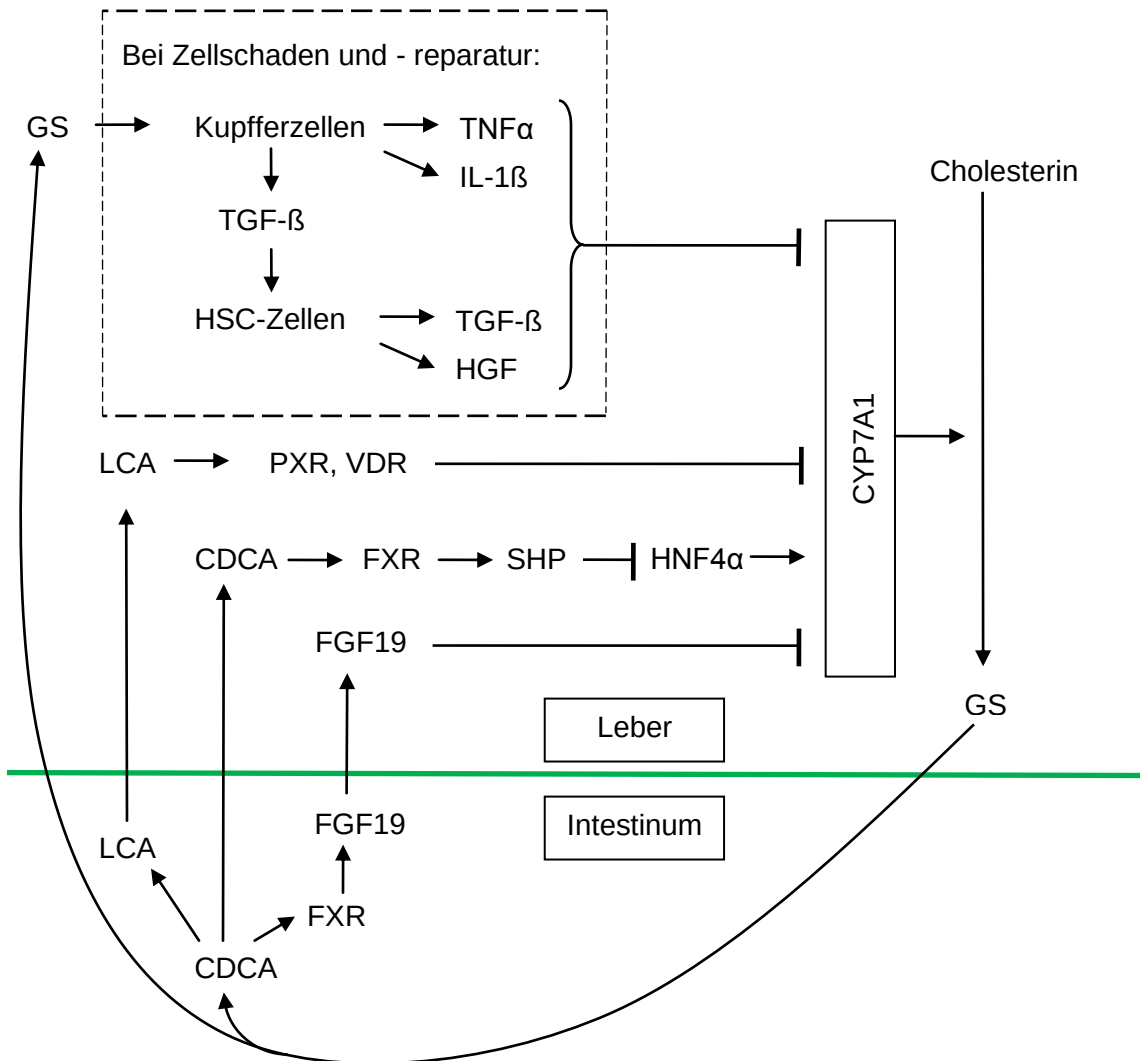


Abbildung 4: Signalwege der Regulation der humanen Gallensäurensynthese. Die Gallensäurensynthese aus Cholesterin wird durch Inhibition der Cyp7a1 Genexpression über FXR-abhängige und FXR-unabhängige Signalwege gehemmt. Chenodesoxycholsäure (CDCA) und andere Gallensäuren (GS) in den Enterozyten aktivieren Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), das daraufhin dort „fibroblast growth factor-19“ (FGF19) hochreguliert. FGF19 wird an die Leber zurücktransportiert wo es CYP7A1 herunterreguliert. FXR wird auch in der Leber durch Gallensäuren aktiviert, sodass es dort SHP induziert, und dieses die hochregulierende Wirkung von „hepatocyte nuclear factor 4α“ (HNF4α) auf CYP7A1 blockiert. Lithocholsäure (LCA), das über den enterohepatischen Kreislauf in die Leber gelangt, aktiviert PXR und VDR die jeweils CYP7A1 herunterregulieren. Bei Leberzellschäden aktivieren Gallensäuren Kupfferzellen die TNFα, IL-1β und TGF-β sezernieren. TGF-β aktiviert HSC-Zellen (engl. „hepatic stellate cells“, dt. Ito-Zellen) die auch TGF-β und HGF sezernieren. Die von den Kupffer- und Itozellen sezernierten Faktoren inhibieren die Cyp7a1 Genexpression.

FXR/FGF19/FGFR4 Signalpfad

In den Enterozyten binden die aufgenommenen Gallensäuren intrazellulär an FXR, das daraufhin die „*fibroblast growth factor-19*“ (FGF19) Genexpression induziert (Pandak et al. 1995, Holt et al. 2003). FGF19 wird im Ileum in den Portalkreislauf sezerniert und aktiviert einen „*fibroblast growth factor R4*“ (FGFR4)-abhängigen Signalweg in Hepatozyten, um die CYP7A1 Genexpression zu inhibieren (Yu et al. 2000). Es gibt Literaturhinweise, dass der FXR/FGF19/FGFR4 Signalpfad gegenüber dem FXR/SHP Signalpfad die bedeutendere Rolle bei der Feedback-Inhibierung der Gallensäuren-Synthese über CYP7A1 aufweist (Kerr et al. 2002, Wang et al 2002, Kim et al. 2007). Demgegenüber spielt der FXR/SHP Signalpfad über Feedbackregulierung des CYP8B1 Levels eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Verhältnis zwischen CA und CDCA hat (Ito et al. 2005, Yu et al. 2000).

FXR spielt also nicht nur eine zentrale Rolle bei der Regulation der Gallensäuren-Synthese, sondern auch bei der Gallensäurenexkretion, und beim Gallensäuretransport (Houten et al. 2006, Thomas et al. 2008a, Lefebvre et al. 2009, Watanabe et al. 2006) in dem es die Expression von Genen regulatorischer Enzyme in der Leber und im Intestinum moduliert, die den enterohepatischen Kreislauf regulieren (Scotti et al. 2007, Kuipers et al. 2004, Modica et al 2008).

Aktivierung von FXR durch toxische Gallensäuren führt zur Apoptose bösartig veränderter Tumorzellen und zur Inhibition der Expression von CYP7A1, sodass FXR protektiv gegen die Entwicklung kolorektaler Karzinome und bösartiger Lebertumoren wirkt. Die Tumorneigung von FXR^{-/-} Mäusen zeigt keine Veränderung bei Behandlung mit dem Gallensäuren-bindenden Cholestyramin (Modica 2008). Ohne FXR Aktivität kommt es zur Inflammation, Zellproliferation und Tumorgenese im Intestinum (Maran 2009).

FXR unabhängige Pfade

CYP7A1 wird auch unabhängig von FXR inhibiert. Die Leber wird über die nukleären Rezeptoren, PXR und VDR gegen das hochtoxische LCA geschützt. Dabei aktiviert LCA PXR und VDR, um CYP Enzyme und die Sulfotransferase SULT2A1 zur Detoxifikation des LCA zu induzieren. Wenn PXR und VDR LCA als Ligand binden, können sie auch an den CYP7A1 Promotor binden, wodurch die Bindung von Induktoren der CYP7A1 Genexpression an den Promotor verhindert wird, sodass die Gallensäurensynthese

verlangsamt wird (Staudinger et al. 2001, Li et al. 2004, Han et al. 2009).

Bei der Akute Phase Reaktion nach Leberzellschäden führen Gallensäuren zur Sezernierung der Zytokine „transforming growth factor β “ (TGF- β), „tumor necrosis factor α “ (TNF α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) aus Kupffer-Zellen (Makrophagen) in der Leber (Li et al. 2006). TGF β -1 aus Kupfferzellen aktiviert den Toll-like Rezeptor 4 der Ito-Zellen (engl. „hepatic stellate cells, HSC). Aktivierte Ito-Zellen sezernieren weiteres TGF- β und „hepatocyte growth faktor“ (HGF). TNF α , IL-1 β und HGF aktivieren Signalwege im Hepatozyten, die eine Inhibition der CYP7A1 Genexpression bewirken, zum Teil über „mitogen activated protein kinase“ (MAPK) (Li und Chiang 2007). Diese Mechanismen schützen die Leber gegen Gallensäuren-induzierte Toxizität im Verlauf der Regeneration.

LXR

In der Maus kommt es bei hohem Cholesterinlevel zur Erhöhung der Gallensäuren-Synthese, indem das Oxysterol-bindende LXR α aktiviert wird, und das aktivierte LXR α CYP7A1 durch Bindung an den CYP7A1 Promotor induziert. Dagegen bindet LXR α nicht an den humanen CYP7A1 Promotor (Chiang et al. 2001); stattdessen führt LXR α Aktivierung in humanen Hepatozyten zur Verminderung der CYP7A1 Genexpression (Goodwin et al. 2002). CYP8B1 wird auch in der Maus nicht von LXR aktiviert, sodass es bei LXR Aktivierung zur Verschiebung des Gallensäurenprofils zum Nachteil des CA kommt (Vlahcevic et al. 2000). Die Wirkung von FXR und LXR auf die Gallensäurensynthese wird dadurch entfaltet dass sie Heterodimere mit dem Corezeptor „retinoid X receptor“ RXR α bilden wenn Gallensäuren an RXR binden (Russel 2003).

1.1.5 Pathophysiologie der Gallensäuren

Defizienz von Enzymen der Gallensäurensynthese

Mutationen in Genen die Enzyme der Gallensäurensynthese kodieren (siehe Abbildung 2), führen zur Defizienz der entsprechenden Enzyme und gehen mit der Akkumulation von Zwischenprodukten der Gallensäurensynthese und anderen Sterolen einher. Im Folgenden wird die Pathophysiologie sieben solcher Erkrankungen diskutiert. Zellweger Syndrom, die infantile Refsum Erkrankung und die neonatale Adrenoleukodystrophie gehen mit einer genetisch bedingten Störung der Peroxisomenbildung einher (Brul et al.

1988). Sie werden in diesem Zusammenhang erwähnt, weil die letzten Schritte der Synthese primärer Gallensäuren in den Peroxisomen stattfinden, und es deshalb auch bei diesen Erkrankungen zur Synthese von hepatotoxischen Zwischenprodukten der Gallensäurensynthese kommt. Zu den klinischen Folgen der Gallensäurebildungsstörungen gehören Gallensteine, Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, und progressive Neuropathie. Cholesteringallensteine, die circa 80% aller Gallensteine ausmachen, bestehen auch in Abwesenheit dieser genetischen Erkrankungen hauptsächlich aus Cholesterin (Berr et al. 1992). Werden Gallensäuren nicht in ausreichender Menge synthetisiert, fällt Cholesterin in der Gallenflüssigkeit aus; es bilden sich Cholesterinkristalle, die Gallensteine bilden können.

CYP7A1-Defizienz

Bei der Cholesterin 7 α -Hydroxylase Defizienz resultiert eine Deletion zweier Basenpaare im Exon 6 des CYP7A1-Gens in der Synthese eines Proteins ohne enzymatische Aktivität. Beim Menschen kommt es dadurch zur Hypercholesterinämie, zur Erhöhung des Cholesterinspiegels in der Leber und zur stark verminderten Gallensäurenexkretion. Betroffene Patienten entwickeln Gallensteine und Atherosklerose früher als nicht betroffene Individuen. Die humane Cholesterin 7 α -Hydroxylase Defizienz ist resistent gegen eine Behandlung mit Statinen (Pullinger et al. 2002). Anders als beim humanen Phänotyp sind die Blutfettwerte im Mausmodell unverändert (Ishibashi et al. 1996).

CYP27A1-Defizienz

Es sind bisher mehr als 40 Mutationen des CYP27A1 Gens bekannt, die der Sterol 27-Hydroxylase Defizienz zugrunde liegen. Sterol 27-Hydroxylase Defizienz führt zur zerebrotendinösen Xanthomatose (CTX, engl. „cerebrotendinous xanthomatosis“), bei der es zur Abnahme der Synthese normaler Gallensäuren, zur Erhöhung der Cholesterin- und Cholestanolwerte im Blut und im Gewebe kommt. Durch Akkumulation von Sterolen, wie das 5 α -reduzierte Cholesterin, Cholestanol, in den Myelinscheiden des Gehirns, kommt es zu einer progressiven neurologischen Dysfunktion mit Demenz, Rückenmarksparese und cerebellärer Ataxie, die unbehandelt zum Tode führt (Cali et al. 1991). Die Therapie besteht in der oralen Gallensäuresubstitution und erlaubt eine gute Prognose, wenn die Erkrankung früh erkannt wird.

CYP7B1-Defizienz

Oxysterol 7 α -Hydroxylase Defizienz entsteht durch eine Mutation im Exon 5 des CYP7B1-Gens, die zum frühzeitigen Abbruch der Synthese des Enzyms führt. Durch die fehlende CYP7B1 Aktivität kommt es zu stark erhöhtem Oxysterolspiegel im humanen Serum und Urin und zur Bildung von ungesättigten Monohydroxygallensäuren, die auch im Urin nachweisbar sind. Zusätzlich kommt es zur fehlenden enzymatischen Aktivität des CYP7A1 Enzyms (Setchell et al. 1998), die mit einer Inhibierung des Enzyms durch akkumulierte Oxysterole in Verbindung gebracht wird (Russel 2003). Durch die Erkrankung kommt es auch bei oraler Gallensäurenbehandlung zur Cholestase, zur Leberzirrhose und zum Leberversagen.

HSD3B7-Defizienz

Es sind 12 verschiedene Mutationen des HSD3B7-Gens bekannt, die zur Inaktivität der 3 β -Hydroxy-delta(5)-C27-Steroid Oxidoreduktase führen (Schwarz et al. 2000, Cheng et al. erstmals in Russel 2003 publiziert). Im Blut und im Urin der betroffenen Patienten kommt es zur Akkumulation von Produkten der 7 α -Hydroxylierung der klassischen und alternativen Synthesewege, den hepatotoxischen C24 und C27 Steroiden mit 3 β -Hydroxy-delta(5) Strukturen. Neugeborene mit dieser Erkrankung entwickeln einen Ikterus, Lebervergrößerung, Mangel fettlöslicher Vitamine und Lipidmalabsorption. Der Wirkmechanismus der effizienten kurativen oralen Gallensäurensubstitution besteht darin, dass sie die CYP7A1 Expression herunterreguliert, sodass keine weitere cholestatische Zwischenprodukte der Gallensäurensynthese entstehen (Russel 2003).

AKR1D1-Defizienz

Die Defizienz der Delta(4)-3-Oxosteroid-5 β -Reduktase (AKR1D1, Aldoketoreduktase1d1) ist von einer fehlenden Aktivität des Enzyms (Setchell et al. 1988) und fehlender AKR1D1-Antikörperreaktion in Leberproben betroffener Individuen gekennzeichnet (Russel und Setchell 1992), jedoch ist die molekulare Basis der Erkrankung nicht eindeutig geklärt. Die metabolische Konsequenz der fehlenden AKR1D1 Aktivität ist, dass es zur Akkumulation von Delta(4)-3-Oxo-Gallensäuren und 5 α -reduzierten Gallensäuren (Allo-Gallensäuren) in der Leber kommt. Ohne medikamentöse Behandlung verursachen diese hepatotoxischen Gallensäuren Leberversagen. Allo-Gallensäuren entstehen mithilfe von

membrangebundenen 5 α -Reduktase-Enzymen, welche die Delta(4)-Bindung der Delta(4)-3-Oxo-Gallensäuren reduzieren (Russel et al. 1994). Die Erkrankung wird mit oraler Gallensäurensubstitution effektiv therapiert (Russel 2003).

AMACR-Defizienz

Die 2-Methylacyl-Coenzym A Racemase Defizienz (AMACR-Defizienz) wird von Punktmutationen im zugehörigen kodierenden Gen *AMACR* verursacht. Die Erkrankung kann während der Kindheit zu Leberfunktionsstörungen führen, die sich in Abhängigkeit des jeweiligen Phänotyps bis zum Erwachsenenalter aufheben können, aber eine Neuropathie beim Erwachsenen verursachen, vermutlich aufgrund einer progressiven Akkumulation der Phytansäure, die beim Gesunden in ausreichender Menge über Pristansäure abgebaut wird (Russel 2003). Patienten mit AMACR-Defizienz entwickeln eine progressive sensomotorische Neuropathie als Erwachsene und haben erhöhte Plasmawerte für Pristansäure, einer polyisoprenoiden (verzweigtkettigen) Fettsäure, und für C27-Gallensäuren. Dabei sind die C27-Gallensäuren funktionsfähig, sodass die Leberfunktion und Resorption der Nahrungsfette im physiologischen Bereich sind. Die Symptomatik wurde auf die erhöhten verzweigtkettigen Fettsäuren zurückgeführt, und es wurde eine Karenz dieser Fettsäuren empfohlen (Russel 2003). Dieser Rückschluss wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass es bei der infantilen Refsum Erkrankung zur progressiven Neuropathie kommt, die von einer Akkumulation von verzweigtkettigen Fettsäuren verursacht wird (Choksi et al. 2003). Bei ausgeprägtem Phänotyp kommt es im Säuglingsalter zu einer Koagulopathie, zu Vitamin D und E Mangel, und einer leichten Leberfunktionsstörung. Die Therapie besteht in der oralen Cholansäuresubstitution (Ferdinandusse et al. 2000).

DBP-Defizienz

Ferdinandusse et al. (2006) berichten von 61 verschiedenen Mutationen des DBP kodierenden Gens *HSD17B4*, die jeweils eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase IV Defizienz (DBP-Defizienz, engl. „D-bifunctional protein deficiency“) verursachen. Bei dieser Erkrankung kommt es zur Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFAs „very long chain fatty acids“), von α -Methyl-verzweigtkettigen Fettsäuren wie Pristansäure, und von di- und trihydroxy-Gallensäurenzwischenprodukten. Klinisch zeigen sich neonatale Hypotonie, Krampfanfälle, kraniofaziale Dysmorphien und eine fehlende

Entwicklung, und in den meisten Fällen kommt es innerhalb der ersten 2 Lebensjahre zum Tod der betroffenen. Eine wirksame Behandlung der DBP-Defizienz ist nicht bekannt.

1.2 AKR1B7

Aldoketoreduktasen (AKR) sind Oxidoreduktasen, die Carbonylverbindungen zu entsprechenden Alkoholen reduzieren (Bohren et al. 1989). Die Superfamilie der Aldoketoreduktasen beinhaltet mehr als 150 NADPH-abhängige zytoplasmatische und mikrosomale Enzyme im Tier- und Pflanzenreich (Ge et al. 2011). Bevorzugte Substrate der AKR sind Monosaccharide, Steroide, aliphatische und aromatische Aldehyde und Ketone, Prostaglandine sowie Xenobiotika (Jez et al. 1997).

Seit 1996 gibt es eine systematische Nomenklatur der AKR Superfamilie. Die AKR's werden nach Sequenzidentität in die Familien AKR1-AKR15 eingeteilt, die sich in circa 60% ihrer Sequenzen unterscheiden. Manche der Subfamilien unterscheiden sich um weniger als 40% ihrer Sequenzen. Ein Familienbaum mit Informationen zur Substratspezifität der AKR-Familien befindet sich auf der Website Perelman School of Medicine der Universität von Pennsylvania, USA, an folgender Adresse <http://www.med.upenn.edu/akr/> (Hyndmann et al. 2003).

Aldoketoreduktase1b7 (AKR1B7, veraltet engl. „mouse vas deferens protein“) ist Mitglied 7 der größten AKR-Familie, Familie 1 (Jez et al. 1997) und ist ein murines Enzym. Pailhoux et al. haben 1992 die DNA des Enzyms sequenziert. Wie jede andere Aldoketoreduktase hat AKR1B7 das „ α/β 8-barrel“ Motiv der Superfamilie, eine katalytische Tetrade, substratdefinierende Proteinschlaufen (engl. „loop structures“) und eine konservierte Cofaktor-Bindungsstelle. Im Gegensatz zu den AKR2, AKR6 und AKR7 Familien die Multimere bilden, liegt AKR1B7 wie die meisten Aldoketoreduktasen als monomeres Protein vor und hat mit einer Länge von ca. 316 Aminosäuren eine ähnliche Länge wie die meisten AKRs.

Lokalisation

Obwohl AKR1B7 hauptsächlich im Intestinum exprimiert wird (Pastel et al. 2012), wurde es erstmals von Taragnat et al. in 1986 im Vas Deferens der Maus identifiziert, daher kommt die ursprüngliche Bezeichnung. Eine hohe basale Expression des Enzyms wurde

in der Zona fasciculata der Nebenniere beschrieben (Lau et al 1995). Das Enzym wird auch in den Gonaden, in den Augen, in der Leber und in den Nieren exprimiert (Pailhoux et al. 1990, Lau et al 1995, Brockstedt et al. 2000, Martinez et al. 2001, Schmidt et al. 2011).

Regulation

Eine Androgenabhängigkeit der Vas deferens Expression und eine Adrenocorticotropin-Abhängigkeit der hohen Expression in Nebennieren wurden ermittelt (Taragnat et al. 1988, Lefrancois-Martinez et al. 1999). Die Induktion im Ovar wurde auf die Wirkung des luteinisierenden Hormons (LH) zurückgeführt (Brockstedt et al. 2000).

Schmidt et al. (2011) haben die anatomischen Lokalisationen der FXR-abhängigen Hochregulierung von Akr1b7 ermittelt. Nach Behandlung von Wildtyp-Mäusen und FXR-Knockout Mäusen mit einem FXR-Agonisten war die Akr1b7-mRNA-Expression im Kolon der Wildtyp-Mäuse gegenüber den FXR-Knockoutmäusen vierfach induziert. Auch im Ileum und in der Leber war die FXR-Abhängige Akr1b7-mRNA-Expression sehr hoch. Die Daten haben gezeigt, dass Akr1b7 durch die Wirkung von FXR in Kolon, Ileum und Leber induziert wird. Die Akr1b7-Transkription wird von FXR reguliert, indem FXR durch Gallensäuren aktiviert wird, sodass sich ein FXR/RXR α Heterodimer bildet der direkt an den FXR response Element im Akr1b7-Promotor bindet. Obwohl Akr1b7 durch LXR-, PXR- und CAR-Agonismus im murinen Intestinum induziert wird, ist FXR dort der wirksamste Induktor (Liu et al. 2009, Schmidt et al. 2011). Bisher wurde in der Literatur nicht beschrieben, welcher nukleäre Rezeptor in der Leber der stärkste AKR1B7-Induktor ist.

Im Akrb7 Promotor liegen die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die Akr1b7 im Intestinum und in der Leber induzieren, beieinander. Die FXR Bindungsstelle endet 280 Basen vor der Transkriptionsregion (-280), gefolgt von der CAR/PXR Bindungsstelle die bei -236 endet, und drei LXR-Bindungsstellen bei -244, -221, und -153 (Schmidt et al. 2011, Pastel et al. 2012). Die LXR-Bindungsstellen sind auch in der Akr1b7 Induktion in der Nebenniere involviert, sowie auch die drei SF-1 Bindungsstellen die bei -503, -458, -102 enden, die CCAAT Enhancer Binding Protein (C/EBP) Bindungsstelle bei -61 und die „selective promoter factor 1“ (Sp1) Bindungsstelle bei -52 (Aigueperse et al. 2001, Martinez et al. 2003, Val et al. 2004).

Funktion

In der Nebenniere reguliert ACTH die Expression von Enzymen die für die Steroidsynthese verantwortlich sind und bewirkt dort eine Akr1b7 Induktion. AKR1B7 entgiftet Isocaproaldehyd, das als toxisches Produkt der Seitenketten-Abspaltung von Cholesterin in steroidogenen Gewebe entsteht (Lefrancois-Martinez et al. 1999). Im Kortex der Nebenniere katalysiert AKR1B7 die Reduktion von Prostaglandin H₂ zu Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α). PGF₂ α vermindert die Ausschüttung von Katecholaminen aus der Medulla der Nebenniere, sodass die Wirkung von ACTH auf die Glukokortikoidproduktion vermindert wird. Somit wurde AKR1B7 nicht nur eine entgiftende Funktion, sondern auch eine Beteiligung an einer parakrinen Feedbackregulation der Glukokortikoidproduktion innerhalb der Nebenniere zugeschrieben (Pastel et al. 2012).

Außerdem ist AKR1B7 ein antiadipogener Faktor der die Expansion von weißem Fettgewebe limitiert, indem es den Prostaglandin F₂ α -Level *in vivo* reguliert (Pastel 2012), und wirkt der Adipozytenhypertrophy entgegen, indem es 4-Hydroxynonenal, als Signalmolekül und Endprodukt der Lipidperoxidation, reduziert (Martinez et al. 2001). Das toxische Malondialdehyd, als Endprodukt der Lipidperoxidation im Intestinum und Biomarker der Lipidperoxidation, gehört auch zu den bisher erforschten Substanzen die von AKR1B7 reduziert werden (Liu et al. 2009). Ge et al. (2011) haben gezeigt, dass die Hochregulierung von AKR1B7 in der Leber den Glukosespiegel im Blut, und die hepatische Triglyzerid- und Cholesterinspiegel senkt.

Wegen der protektiven Rolle von FXR gegen Kolonkrebs, der Aktivierung von FXR durch Gallensäuren im Zusammenhang mit der Toxizität mancher Gallensäuren, wegen der von FXR induzierten Hochregulation von AKR1B7 im Darm, und der Lipidperoxid-entgiftenden Funktion von AKR1B7 in anderen Geweben, wurde postuliert, dass AKR1B7 Gallensäuren im Darm entgiftet.

1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu untersuchen, ob und gegebenenfalls welche Gallensäuren Substrate von AKR1B7 sind. Um dies zu erforschen, soll Akr1b7 aus muriner Nebenniere geklont und transgen in HEK293-Zellen exprimiert werden. Um die AKR1B7 Expression in HEK293-Zellen überprüfen zu können, soll Akr1b7 mit einem FLAG-Peptid getaggt und die AKR1B7 Expression immunhistochemisch sowie mittels Westernblot analysiert werden. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS) soll geprüft werden, ob AKR1B7 an der Metabolisierung unterschiedlicher Gallensäuren beteiligt ist. Dazu sollen HEK293-Zellen mit Akr1b7-kodierendem Vektor oder Kontrollvektor transfiziert werden. Nach Behandlung der Zellen mit Gallensäuren soll ein Lipidextrakt hergestellt werden, um mittels LC/MS die Umwandlung zu mono-, di- und tri-hydroxy- und keto-Gallensäuren zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen festzustellen, ob die FXR-abhängige Induktion von AKR1B7 zur protektiven Wirkung von FXR gegen kolorektale Tumorerkrankungen beitragen könnte.

2. Material und Methoden:

Materialien und Methoden, die im Rahmen vorliegender Promotionsarbeit verwendet wurden, sind in diesem Kapitel vorgestellt. Der Standort eines Materialherstellers wird nur bei Erstnennung des Materialherstellers angegeben. Wenn nicht anders angegeben wurden Verbrauchsmaterialien der Firma Agilent Technologies verwendet. Gerätehersteller und –model werden nur bei deren Erstnennung angegeben.

2.1 Präparation der Gewebeproben

Nebennierengewebe wurde von Dr. Daniel Schmidt, Department of Pharmacology, UTSW, Dallas, USA zur Verfügung gestellt. Es entstammt männlichen C57BL/6 Mäusen (Charles River Laboratories, USA), die durch Enthauptung getötet wurden. Alle Mäuse wurden in der gleichen, spezifiziert pathogenfreien Anlage unter temperaturkontrollierten Bedingungen und einem 12 h-Tag/Nacht-Zyklus gehalten, mit Wasser und strahlenkonserviertem Nagetierfutter (*irradiated rodent chow* TD.2916, Harlan-Teklad, USA) ad libidum gehalten. Alle Tierexperimente wurden vom „Institutional Animal Care and Research Advisory Committee“ des University of Texas Southwestern Medical Center genehmigt.

2.2 RNA-Isolierung

Nebennieren wurden unmittelbar nach Tötung entnommen und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren (Schmidt et al. 2011). Daraus wurde die Gesamt-RNA-Extraktion folgendermaßen durchgeführt:

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von RNA STAT-60™ (IsoTex Diagnostics, USA) extrahiert. Es handelt sich dabei um eine modernisierte Version der Ein-Schritt-Methode der RNA-Isolierung durch Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion, die erstmalig von Chomczynski et Sacchi (1987) beschrieben wurde. Nur beim Ausfällen der RNA wurde von den Herstellerangaben abgewichen, um zu berücksichtigen, dass eine Kontaminierung durch Proteoglykane und Polysaccharide verhindert werden kann, indem ein Anteil des Isopropanols mit einer RNA-Ausfällungslösung substituiert wird, die eine hohe Salzkonzentration aufweist. (Chomczynski and Mackey 1995). Die RNA-

Ausfällungslösung bestand aus einer 1,2-molaren NaCl und 0,8-molaren Dinatriumcitrat (Sigma, USA) Reinstwasserlösung. Im Anschluss an die RNA-Gesamtextraktion erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung. Wenn nicht anders angegeben, wurden Proben und Lösungen bei 4°C auf Eis gehalten.

Homogenisierung

Die Homogenisierung der gefrorenen Proben erfolgte in 1ml RNA STAT-60™ pro 100mg Gewebe mit einem Polytron Homogenisator in 15 ml RNasefreien Rundboden Reaktionsgefäßen (Invitrogen, Carlsbad, USA).

RNA-Extraktion

Nach fünfminütiger Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Chloroform/ 1 ml RNA STAT-60 hinzugegeben, die Proben 20 s per Vortex geschüttelt und 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde das Schütteln für alle Proben wiederholt und danach fünf Minuten auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurde bei 12000 g 20 min. zentrifugiert (Thermo Scientific Sorvall Biofuge Heraeus System) mit dem Ergebnis einer oberen farblosen wässrigen Phase die RNA enthält, einer weißlichen DNA-haltigen Zwischenphase und einer unteren roten Phenol-Chloroform-Phase die Proteine enthält.

RNA Ausfällen

Zwei Volumenanteile der wässrigen Phase wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit jeweils einem Teil Isopropanol und RNA-Ausfällungslösung „gevortext“ und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA-Ausfällungslösung bestand aus einer 1,2-molaren NaCl und 0,8-molaren Dinatriumcitrat (Sigma) Reinstwasserlösung. Anschließend wurde 15 min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert (Biofuge Heraeus) und der Überstand abgesaugt.

RNA waschen und auflösen

Das RNA-Plättchen wurde mit 1 ml 75% Ethanol in Diethyl-Pyrocbonat Wasser (DEPC-H₂O) pro 1 ml RNA-STAT gewaschen, bei 4°C und 7.500g zentrifugiert (Biofuge Heraeus), im RNasefreien Probenröhrchen (Invitrogen, Carlsbad, USA) luftgetrocknet, und

anschließend in nukleasefreiem Wasser gelöst. Das DEPC-H₂O wurde hergestellt indem 1ml Diethyl Pyrocarbonat in 1L ddH₂O gemischt und anschließend autoklaviert wurde. Im Anschluss erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung.

2.3 Reverse Transkription (RT)

Um eine Ausgangsmatrize für die Amplifikation im Rahmen der PCR zu erhalten, wird eine zur kompletten RNA komplementären cDNA synthetisiert. Zu dieser Synthese ist das Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) befähigt (Carothers et al. 1989). Aus cDNA können Inserts mit der interessierenden Gensequenz hergestellt werden.

Vier Microgramm Nebennieren-Gesamt-RNA-Probe wurde mit *random* Hexameren („Primer random p(dN)₆“ Roche, Mannheim, Deutschland) mittels Reverse Transkriptase-PCR revers transkribiert, um komplementäre DNS (cDNA) herzustellen. Es wurden „ABI High Capacity Reverse Transcriptase“ (Applied Biosystems, USA) als Reverse Transkriptase und mitgelieferte Reagenzien, sowie Reaktionsgefäße der gleichen Firma verwendet.

Der RT Ansatz enthielt: 4 µg RNA, 8 µl 10x RT Puffer, 3,2 µl 25X dNTP, 8 µl 10x Random Primer, 0,2 µl RNase Inhibitor, 2 µl Reverse Transkriptase (200U / µl), 58,6 µl RNase/DNase freies Wasser. Der Ansatz wurde in PCR-Gefäße gegeben und die reverse Transkription im Thermocycler im folgenden Temperaturzyklus durchgeführt: 2 Stunden Reverse Transkription bei 37°C, 5 min Denaturierung bei 85°C, Kühlung bei 4°C bis zur Weiterverwendung für PCR.

2.4 PCR

2.4.1 Primer

Es folgt eine Beschreibung der Sequenzierungs- und Klonierungsprimer, sowie ihrer Entwurfs- und Herstellungsweise.

Primerdesign

Die Restriktionsendonukleasen HindIII und BamHI wurden gewählt, weil ihre Schnittstellen in beiden Zielvektoren pCMX und p3XFLAG vorkommen und in den interessierenden Sequenzen nicht vorkommen.

Um sicher zu stellen das die Restriktionsenzymsschnittstellen nicht in den interessierenden Sequenzen vorkommen, wurden beide Sequenzen miteinander verglichen. Dazu wurden Gensequenzen der NCBI Nucleotide Database verwendet. Die interessierenden Sequenzen waren die Akr1b7 und Crad2 Kodierungssequenzen (CDS). Die CDS Position im interessierenden Gen wurde im NCBI Nucleotide Database in GenBank Format angegeben. (Nucleotide Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>)

Weil DNA Polymerasen nur in 5' - 3' Richtung synthetisieren, wurde die komplementäre Sequenz für den 3' Primer verwendet. Analysen erfolgten mithilfe des online Programms OligoAnalyzer 3.1 Integrated DNA Technologies ("<http://eu.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>"). Es zeigte komplementäre Sequenzen, Primerlängen, GC Gehalt und Schmelztemperatur (Tm) an.

Beim Primerentwurf wurden folgende Regeln und Guidelines von Innis und Gelfand (1990), teilweise von Vernon et al. (2001) berücksichtigt: Primerlänge sollte zwischen 17 und 28 Basen sein, GC-Gehalt sollte 50%-60% betragen, Primer sollten am 3' Ende in als G oder C, oder CG oder GC enden, Sequenzen von drei oder mehr C oder G am 3' Ende sollte vermieden werden, Primer 3' Enden sollten zueinander nicht komplementär sein, und Primer sollten nicht selbst-komplementär sein. Tm eines Primerpaars (für eine PCR eingesetzte Primer) müssen sich ähneln und sollten vorzugsweise zwischen 50-80 °C liegen.

Überlegungen bezüglich Primersequenz und zugehöriger Tm erfolgten nach der Wallaceformel $Tm = 4(G+C) + 2(A+T)^{\circ}C$ (Suggs et al. 1981, Thein and Wallace 1986).

Um ausreichendes Annealing zu begünstigen wurde eine Templatessequenz der Basenlänge 10 nach einer Loopsequenz angehängt und eine Templatessequenz der Basenlänge 4-6 wurde vor einer RE-Schnittstelle angehängt.

Primerspezifität wurde mithilfe des NCBI Standard Nucleotide BLAST

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome

und dem Database "mouse genomic plus transcript", "optimized for highly similar

sequences (megablast)“ geprüft. Nur „transcript“ Ergebnisse wurden als unspezifische Stellen berücksichtigt, weil cDNA als Template verwendet wurde. Dies war ausreichend weil cDNA von mRNA abgeleitet wird, und „transcript“ sich auf mRNA bezieht.

Hoher „query coverage“ wurde ignoriert, wenn die letzten zwei Primerbasen nicht zu diesen beigetragen haben, weil die Polymerase einen Strang ohne Annealing der letzten zwei Basen nicht verlängern kann. Alle Primer wurden vollständig synthetisiert erworben (Mc Dermott Center Sequencing Core Facility, Dallas,USA).

Amplifikationsprimer

Die Zielvektoren pCMX und p3XFLAG besitzen HindIII und BamHI Schnittstellen, letzteres downstream des ersteren. Zum subklonieren in diese Zielvektoren wurden daher Upstreamprimer mit HindIII Schnittstellen, und Downstreamprimer mit BamHI Schnittstellen versehen. Um Akr1b7 und Crad2 in pCMX zu subklonieren wurden Primer entworfen mit denen die gesamte Kodierungsregion der interessierenden Sequenz, also inklusive Startcodon, amplifiziert werden konnte. Weil der p3XFLAG Vektor bereits ein Startcodon vor dem 3XFLAG peptid besitzt und Inserts für Subklonierung in p3XFLAG downstream des 3XFLAG peptids eingesetzt wurden, enthielten Upstreamprimer zum Subklonieren in p3XFLAG keinen Startcodon. Downstreamprimer für Subklonierungen in beide Zielvektoren enthielten den Stoppkodon der Kodierungsregion des jeweiligen Gens.

Sequenzierungsprimer

Sequenzierungsprimer für Sequenzierung aus FLAG-Ligationen: Das FLAG peptid in p3XFLAG ist direkt upstream der HindIII Schnittstelle, und BamHI ist downstream des Stoppcodons. Daher wurden der Forwardprimer “p3XFLAGfwd” und der Reverseprimer “p3XFLAGrev” so entworfen, dass die jeweilige Sequenz 30 Basen upstream des FLAG peptids, beziehungsweise 30 Basen downstream der BamHI Schnittstellen enthielt.

Primersequenzen

In der Tabelle 1 sind die Primersequenzen, ihre jeweilige T_m und %GC angegeben. Namen der Forwardprimer beginnen mit „5“ oder enthalten „fwd“. Namen der Reverseprimer beginnen mit „3“ oder enthalten „rev“. HindIII schneidet die Sequenz AAG CTT, BamHI schneidet die GGA TCC Sequenz.

Name	Sequenz	Tm	%GC
5'mAkr1b7-HindIII	TGA CAC AAG CTT GTC GAC GAA G	58	50
5'mAkr1b7-1-HindIII	GGA AGC TTC GGA GGT TGC TC	59	60
3'mAkr1b7-BamHI	CGA ACT GGA TCC TGA CTA TTG GTG	57	50
5'mCrad2-HindIII	GTA GAA GCT TGG ATC TCC GTG TAG G	59	52
5'mCrad2-1-HindIII	GGA TAA GCT TTC CGT GTA GGT CCT TC	60	50
3'mCrad2-BamHI	TCG GGA TCC TGA GAC CCG	60	67
p3XFLAGfwd	GTG TAC GGT GGG AGG TCT ATA TAA GCA G	60	50
p3XFLAGrev	CAA CTT CCA GGG CCA GGA GA	59	60

Tabelle 1: Primer Angegeben sind Primernamen, Sequenz, Annealingtemperatur (Tm), und GC-Gehalt in Prozent

2.4.2 PCR Reaktionsansatz

PCR wurde im Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700 mithilfe der Taq DNA Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland) und mitgeliefertem Puffer nach Herstellerangaben mit folgenden Werten durchgeführt:

<u>PCR- Ansatz</u>	<u>Konzentration</u>
Für jede dNTP (ABI)	0,2mM
PCR-Puffer (Roche)	1 X (1.5 mM MgCl ₂)
Taq DNA Polymerase (Roche)	0,025U/uL
Up- und Downstreamprimer je	0,5 µM
Template DNA	siehe jeweiliges Experiment
qPCR H ₂ O	

Für PCR-Kontrollreaktionen wurde das Template mit einer Kontrolllösung substituiert, welche aus gleichen Bestandteilen bei gleichen Bedingungen hergestellt wurde wie die cDNA, ausser das es bei der Kontrolle kein Gewebe als Ausgangspunkt gab.

2.4.3 PCR Programm

Bei PCR Planung und Durchführung wurde die Publikation Innis and Gelfland (1990) berücksichtigt. So wurde, wenn nicht anders angegeben, die Annealing Temperatur ca. 5°C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) eines Primerpaars gewählt. Die Tabelle 2 gibt das PCR-Programm an.

	Temperatur [°C]	Dauer [min:sec]	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95	05:00	1
Denaturierung	95	00:30	30
Annealing	variabel	00:30	30
Elongation	72	02:00	30
Finale Elongation	72	03:00	1
Kühlen	4	unbestimmt	1

Tabelle 2: PCR Programm. Das bei dieser Arbeit verwendete PCR-Programm ist dargestellt.

2.4.4 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wurden PCR Produkte in einem Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1% Agarosegel verwendet, das aus TAE-Puffer und "GenePure LE Agarose" (ISC BioExpress, USA) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) hergestellt wurde. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA und leuchtet unter UV-Strahlung. Vor Beladung der DNA in die Geltaschen wurde sie mit 20% Ladefarbe (Bromophenolblau, Xylenecyanol) vermischt. Der DNA Standard "1 Kb Plus DNA Ladder" (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde genutzt um Hinweise auf die Größe der aufgetrennten DNA Fragmente zu erhalten. Insofern nicht anders angegeben, dauerte die Elektrophorese etwa eine Stunde bei einer Spannung von 90 Volt. Zu dem Zeitpunkt war ein Teil der Ladefarbe so nahe der Anode, das vor einer ausreichenden Trennung der DNA Fragmente ausgegangen werden konnte. Die DNA wurde anschließend zur Auswertung der Größe der aufgetrennten Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht, und das Gel mit dem Gel Logic 200 Imaging System der Firma Eastman Kodak digital photographiert.

2.4.5 Sequenzierung

Um zu ermitteln ob alle Plasmidinserts die erwartete Sequenz hatten, damit sie für Transfektionsexperimente verwendet werden konnten, wurden sie aus den Plasmiden Akr1b7-pCMX, Akr1b7-p3XFLAG, CRAD2-pCMX, und CRAD2-p3XFLAG sequenziert. Sequenzierung erfolgte im Mc Dermott Center Sequencing Core Facility (Dallas,USA) mit "Applied Biosystems(AB) Big Dye Terminator 3.1 chemistry and AB capillary instrumentation." Sequenzierung aus p3XFLAG-Ligationen wurden mit den Primern „p3XFLAGfwd“ und „p3XFLAGrev“ durchgeführt (siehe Sequenzierungsprimer).

Die Forward- und Reverse-Sequenzierungsprimer „pCMXfwd“, beziehungsweise „pCMXrev“ für Sequenzierung aus pCMX Ligationen, wurden freundlicherweise von Dr. Daniel Schmidt (Department of Pharmacology, UTSW, Dallas, Texas) zur Verfügung gestellt.

2.4.6 Aufreinigung von DNA

PCR Produkte, bei denen keine Gelaufreinigung erfolgte, wurden purifiziert, um sie von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salze zu trennen. Dazu wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde jeweils der gesamte PCR-Ansatz mit dem mitgelieferten Buffer PBI vermischt, und an der mitgelieferten Säule gebunden. Eluation und Aufbewahrung erfolgte wie bei der DNA Gelaufreinigung.

2.4.7 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmungen

DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten im NanoDrop 2000 Spectrophotometer durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}). Es wurde die Absorption zusätzlich bei 280 nm (A_{280}) gemessen, und der A_{260}/A_{280} Quotient errechnet, um ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure zu erhalten. Reinheit wurden angenommen bei einem A_{260}/A_{280} Quotienten von 1,8 für DNA und 2,0 für RNA.

2.5 Klonierung

2.5.1 Plasmid Vektoren

pCMX

Der ampicillinresistente pCMX Vektor der Basenlänge 4595 bp besitzt HindIII und BamHI Schnittstellen in der multiplen Klonierungsstelle in angegebener Reihenfolge (Umesono et al. 1991). Der Vektor wurde zur Genexpression verwendet, damit die Genexpressionsprodukte AKR1B7 und CRAD2 untersucht werden konnten. Er wurde von Dr. Zhu Wang, Department of Pharmacology, UTSW, Dallas Texas zur Verfügung gestellt.

p3XFLAG-CMV-10

Im ebenfalls ampicillinresistenten p3XFLAG-CMV-10 Expressionsvektor (Sigma-Aldrich) (im folgenden nur p3XFLAG) mit der Basenlänge 6299 bp sind HindIII und BamHI Schnittstellen in der multiplen Klonierungsstelle in angegebener Reihenfolge vorhanden. Der Vektor kodiert die FLAG-Peptidsequenz, welche Voraussetzung ist für die Immundetektion von FLAG-Fusionsproteinen. Hierbei wird das Prinzip genutzt, dass die Immundetektion mit Anti-FLAG Antikörper nur bei FLAG-Fusionsproteinen vorkommt.

2.5.2 Inserts

Durch die Verwendung geeigneter Primer wurden Inserts mit einer HindIII Schnittstelle am 5' Ende sowie einer BamHI Schnittstelle am 3' Ende hergestellt.

Akr1b7

Akr1b7 Inserts wurden aus Nebennieren cDNA mittels PCR amplifiziert. Das Akr1b7 Insert für Klonierung in pCMX enthielt die gesamte Akr1b7-Kodierungsregion der Basenlänge (Bp) 951 (NCBI reference sequence: NM_009731.2).

Das Akr1b7 Insert für Klonierung in p3XFLAG enthielt die Akr1b7-Kodierungsregion ohne Startkodon. Das Insert wurde ohne Startcodon (Codon 1) amplifiziert, weil es downstream

des 3XFLAG peptids kloniert wurde und der p3XFLAG Vektor bereits ein Startcodon vor dem 3XFLAG peptid besitzt.

Crad2

Beide Cis-retinol/androgen dehydrogenase type 2 (Crad2) (NCBI reference sequence: NM_017473.4) Inserts wurden analog zu den Akr1b7 Inserts hergestellt. Der Crad2 Insert für Klonierung in pCMX und p3XFLAG enthielten die Crad2 Kodierungsregion mit, beziehungsweise ohne, Startkodon. Auch die Crad2 Kodierungsregion besitzt die Basenlänge 951.

2.5.3 Restriktionsenzymverdau

Zum Restriktionsenzymverdau wurden Restriktionsenzyme und Puffer der Firma New England Biolabs (NEB, hergestellt in Hitchin, United Kingdom) verwendet. Um DNA mittels Restriktionsenzymen zu verdauen, wurde die DNA in sterilem Wasser mit 10% BSA und 10% Puffer 2 (NEB) als zusätzlichem Reaktionspuffer gelöst. Das Enzym BamHI (NEB) oder HindIII (NEB) wurde zuletzt dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Enzym Endkonzentration betrug 0,2 U/µl. Zum Verdau wurde der Reaktionsansatz mindestens drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gelaufreinigung wenn die Fragmente für eine Ligation weiterverwendet werden sollten.

2.5.4 Aufreinigung von DNA

Sollten elektrophoretisch aufgetrennte PCR Produkte weiterverwendet werden, wurden sie aus dem Agarosegel extrahiert. Dazu wurde das "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen,USA) nach Herstellerangaben verwendet. DNA Banden wurden als Gelblock unter UV-Licht in präparativer Einstellung aus dem Agarosegel mit einer sauberen Rasierklinge exzidiert. Der Gelblock wurde im Lösungspuffer aufgelöst, an der mitgelieferten Säule gebunden und anschließend daraus im Elutionspuffer (10mM Tris-Cl) eluiert. Wenn nicht sofort weiterverwendet wurde das Eluat bei 4°C aufbewahrt.

2.5.5 Ligation

Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) Behandlung kann die Ligation von Oligonukleotiden in DNA Vektoren begünstigen, in dem es die Selbstligation linearisierter Vektoren verhindert (Sambrook et al. 1989). Dazu reagierte der restriktionsenzymverdaute Zielvektor mit 0,05 U/ μ l SAP (Roche, Mannheim, Deutschland) in 10% SAP Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland) für 10 Minuten bei 37 °C. Dabei waren Gesamtreaktionsvolumina jeweils 20 μ l. Anschließend wurde SAP 15 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Ligation erfolgte um ein „Backbone“ aus SAP-behandeltem restriktionsenzymverdaulichem Zielvektor mit einem restriktionsenzymverdauten Insert zu ligieren. Ein Ligationsansatz enthielt 10% „T4 DNA Ligase“ (1 U/ μ l) (Roche, Mannheim, Deutschland), 10% mitgeliefertem T4-Ligationspuffer, Backbone und Insert, mit sterilem Wasser auf 10 μ l ergänzt. Backbone und Insert standen im molaren Verhältnis eins zu zwei. Ligationsansätze wurden mindestens drei Stunden bei 25 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Für jede Ligation wurde eine Kontrollreaktion durchgeführt, indem der Insert mit sterilem Wasser substituiert wurde, unter Beibehaltung der gleichen Menge Backbone wie im Ligationsansatz.

2.5.6 Transformation

Bei der Transformation wurden thermokompetente E. Coli Bakterien vom Typ DH5alpha verwendet. Die thermokompetenten E.Coli vom Typ DH5alpha wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Zhu Wang, Department of Pharmacology, UTSW, Dallas Texas, zur Verfügung gestellt. Es wurden jeweils ein auf Eis aufgetautes 50 μ l DH5alpha Aliquot mit 5 μ l Ligationsansatz durch dreifaches Pippetieren vermischt. Die Mischung wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, um Plasmide von den Zellen aufnehmen zu lassen. Um aufgenommene Plasmide in die Zellen einzuschließen, wurde der Transformationsansatz für 60 Sekunden auf 42°C erhitzt. Nachdem sich die Bakterien für zwei Minuten auf Eis erholten, wurde jeder Transformationsansatz in 1 ml LB-Medium 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 3000 rpm zentrifugiert (im Beckmann JA-10), 1 ml Überstand abgesaugt und das Zellpellet im verbleibenden LB-Medium durch Vortexen resuspendiert. Die hier verwendeten Plasmide enthalten Ampicillin-Resistenzgene, welche

nach erfolgter Transformation in den DH5alpha Zellen während der Inkubation exprimiert werden. Daher wurden die Bakterien auf LB-Platten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gewärmt. Es waren Kolonien von transformierten Bakterien zu erkennen, welche durch die eingeschlossenen Plasmide Ampicillinresistenz erhalten hatten.

2.5.7 Animpfen einer Schüttelkultur für Plasmidpräparation

Schüttelkulturen für Mini- und Midi-Plasmidpräparation wurden wie im folgenden beschrieben angeimpft. Nach Transformation wurde je eine Bakterienkolonie einer LB-Selektionsplatte mittels einer sterilen Pipettenspitze in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C bei 250 rpm im Schüttler (Multitron) inkubiert.

2.5.8 Mini-Plasmidpräparation

Mini-Plasmidpräparation wurde mithilfe des GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA) bis zum Neutralisationsschritt nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zentrifugation erfolgte bei 12,000 g. Zellen wurden durch 3-minütige Zentrifugation 1,5 ml DH5alpha Schüttelkultur bei 12,000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, der zellenthaltende Pellet wurde durch Vortexen in 150 µl mitgelieferter Resuspensionslösung suspendiert. Um Zelllyse herbeizuführen wurden 150 µl mitgelieferter Lyselösung hinzupipettiert, das Reaktionsgefäß fünf mal invertiert, und der Lysereaktion 5 Minuten Zeit gegeben, während dessen als Nebenergebnis die DNA denaturiert. Um Renaturierung der DNA zu bewirken wurde Neutralisation durch Hinzufügen 150 µl kalter (4°C) mitgelieferter Neutralisations/Bindungslösung und fünfmaliges invertieren initiiert. Zellreste wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren pelletiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wurde mit 1 ml kaltem (4°C) 100 % Ethanol gevortexed und 30 Minuten bei -80°C gehalten, um Nukleinsäuren zu präzipitieren. Es wurde erneut gevortexed und bei 4°C 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit 4°C kaltem 70% Ethanol gewaschen, 2 Minuten zentrifugiert, getrocknet und in 50 µl 10mM Tris-HCl durch Vortexen resuspendiert. Wenn nicht sofort weiterverwendet, wurden die Mini-Plasmidpräparationen bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden HEK293 Zellen verwendet. Diese wurden von Dr. Zhu Wang, Department of Pharmacology, UTSW, Dallas Texas zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um menschliche embryonale Nierenzellen die immortal sind, also *in vitro* beliebig vermehrt werden können. Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Materialien an einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen zu verhindern.

2.6.1 Zellaufzucht und -passagierung

HEK293 Zellen wurden auf Kulturschalen im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ -Sättigung kultiviert. Nährmedium war DMEM mit 4 g/L Glukose und 584 mg/L L-Glutamin (Gibco,USA) das gebrauchsfertig bezogen und mit 10 % aktivkohlebehandeltes, hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FBS) versetzt war. Zellen wurden bei einer Zelldichte von nahezu 100 % passagiert. Dazu wurden sie mit sterilem PBS gewaschen, mit einer 0,05 % Trypsinlösung (Invitrogen, Carlsbad, USA) von der Kulturschale abgelöst, und in zusatzfreiem DMEM bei 900 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in neuem Nährmedium resuspendiert und auf Kulturschalen ausplattiert.

2.6.2 Transfektion

Für die Transfektion wurden am Vortag 40.000 HEK293 Zellen pro Well auf 6-well Platten in Zellkulturschalen ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ -Sättigung kultiviert. Es wurde eine Zellkonfluenz von ca. 50% bei Transfektion gewählt, um den Zeitpunkt der Überkonfluenz hinauszuzögern, damit Zelleffekte mehr als zwei Tage nach Transfektion untersucht werden konnten. Die Transfektion wurde mit FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche, Mannheim, Deutschland) als Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde das Verhältnis 6:1 Transfektionsreagenz (µl) zu DNA (µg) gewählt. Als Serumfreies Medium (SFM) diente DMEM mit 4 g/L Glucose and L-Glutamin, (Gibco,USA) ohne FBS. In einem Ansatz wurde das Transfektionsreagenz im SFM gelöst, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend die entsprechende Menge DNA hinzugegeben und 15 min inkubiert. Pro Well wurden 120 µl des jeweiligen Ansatzes tropfenweise auf die zu transfizierenden

Zellen pipettiert.

2.7 Proteinbiochemie

2.7.1 Zellernte

Die Zellen wurden mit Lysepuffer geerntet. Sie wurden zunächst einmal mit kalter PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml PBS auf die Zellen gegeben, die dann mit einem Zellschaber abgelöst wurden und in 1,5 ml Tuben bei 12.000 rpm zentrifugiert (Biofuge Heraeus) wurden. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 50 µl Lysepuffer 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden sie 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, und der Proteinüberstand in neue Eppendorf-Gefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Weiterverwendung transferiert.

Lysepuffer: (nach FLAG M2 Bead Protocol, Sigma): 50mM TrisCl Ph 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1X Protease inhibitor cocktail fresh (P8340, Sigma, USA)

2.7.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Als Vorbereitung für das Westernblot wurde die Proteinkonzentration im Proteinüberstand lysierter Zellen bestimmt. Dazu wurde das Bio-Rad DC Protein Assay, als modifizierter Lowry Assay (Lowry 1951) verwendet. Hierbei erfolgt eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration anhand der Entstehung farbiger Komplexe. Das Assay basiert auf die Reaktion von Protein mit einer Kupfertatratlösung (Reagenz A) und Folinreagenz (Reagenz B). Kupferbehandeltes Protein reduziert Folinreagenz und lässt dabei eine Blaufarbe entstehen, die eine maximale Absorption bei 750 nm besitzt. Eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin mit den Konzentrationen 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, and 0,5 mg/ml wurde verwendet um eine Standardkurve zu berechnen. Fünf 5 µl einer zu untersuchenden Probe wurden mit 100 µl reinem Salzwasser und Reagenz A gevortext, und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500 µl Reagenz B dazugegeben, gevortext, und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde 1 ml je Probe in Küvetten pipettiert und im Spektrometer bei 750 nm eine photometrische Doppelbestimmung durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Standardkurve errechnet.

2.7.3 Western Blot

Diskontinuierliche SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diskontinuierliche Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) trennt Proteine ihrer Größe nach, während sie durch eine Polyacrylamid Gelmatrix richtung Anode wandern. Zur Erstellung des Gels wurde ein Sammelgel auf einem ausgehärteten Trenngel gegossen. Vierzig Mikrogramm Proteinprobe in 15 µl Reinstwasser wurden 5 µL 4x SDS Ladepuffer zur Denaturierung der Proteine hinzugegeben. Für jede untersuchte Probe wurde eine Geltasche mit 20 µl der Proteinlösung geladen. In einer Geltasche wurden 10 µl des vorgefärbten „Kaleidoscope“ Molekulargewichtsmarkern der Firma Biorad (CA, USA) geladen. In einer mit 1x SDS Laufpuffer aufgefüllten Laufkammer wurden die Proteine bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel verdichtet, und bei einer Spannung von 140 V im Trenngel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde die Elektrophoresekammer „X Cell Sure Lock“ der Firma Invitrogen verwendet.

Proteintransfer

Anschließend wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Amersham Hybond-P PVDF Membran (Amersham, Piscataway, USA) folgendermaßen übertragen: Zunächst wurde die Membran 10 Sekunden mit Methanol und 5 min mit aqua dest. gespült, dann 15 min in Transferpuffer getränkt. Zwei Filterpapiere und zwei Schwammpads wurden ebenso in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde von der PVDF-Membran bedeckt zwischen den zwei Filterpapieren und Schwammpads platziert sodass ein „Sandwich“ entstand. Dieses „Sandwich“ wurde in der mit Transferpuffer gefüllten Blottkammer so gehängt, dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die anodenseitig ausgerichtete Membran bei einer Stromstärke von 25 mA über Nacht geblottet wurden. Dabei wurde der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker „Kaleidoscope“ (Biorad) zur späteren Größenidentifikation spezifischer Proteinbanden mit auf die Membran geblottet.

Dann wurde die Membran 1 Stunde in 20 ml Blocking-Lösung zur Besetzung freier Proteinbindungsstellen auf der Membran bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T 0,05 % zwei mal fünf Minuten gewaschen.

Immundetektion

Zur Immundetektion FLAG-getaggtter Fusionsproteine wurde das ANTI-FLAG M2-HRP Antikörperkonjugat verwendet. Es besteht aus einem monoklonalen Anti-FLAG-Antikörper aus Maus das mit Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Die Membran wurde mit 1:5000 verdünnter ANTI-FLAG M2-HRP in TBS-T 0,05% 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Minuten in TBS-T 0,05% und dann mit aqua dest. gewaschen.

Zur Detektion gesuchter Banden wurden ECL-Westernblotting Detektionsreagenzien 1 und 2 (Amersham, Piscataway, USA) bei Raumtemperatur eins zu eins gemischt, auf die Proteinseite der Membran gegeben und mit dieser 5 Minuten inkubiert. Die Peroxidase setzt dabei ein Substrat der Detektionsreagenzien um, das Chemilumineszenz erzeugt sodass die gesuchten Banden nach entsprechender Belichtungsdauer und Entwicklung (AFP Imaging Corporation Developer) des Röntgenfilms (Phenix Research Products) im Chemilumineszenz-System sichtbar wurden (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Antikörpertiter, Belichtungszeit und der Molekulargewichtsmarker wurden auf dem Röntgenfilm beschriftet.

Anschließend wurde β -Actin als Ladekontrolle detektiert. Dazu wurde die PVDF-Membran 30 Sekunden mit aqua dest. und 5 Minuten mit TBS gewaschen. Als Primärantikörper wurde ein 1:5000 verdünnter monoklonaler anti- β -Actin Antikörper (Sigma, St. Louis, USA) aus Maus hinzugegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal fünf Minuten in TBS-T 0,05% gewaschen und eine Stunde mit 1:5000 verdünnter Anti-Maus-HRP aus Schaf (Amersham, Piscataway, USA) als Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde die Membran dreimal 5 Minuten in TBS-T 0,05% und dann mit TBS gewaschen. Ansonsten wurde wie bei der Detektion FLAG-getaggtter Proteinbanden verfahren.

Lösungen:

Sammelgel: 1,85 ml ddH₂O, 0,75 ml 4x Tris-Cl/SDS, 0,4 ml 30% Acrylamid/ 0,8 % bisacrylamid, 15 μ l 10 % Ammoniumpersulfat, 3 μ l TEMED

Trenngel: 4,9 ml ddH₂O, 3,5 ml 4x Tris-Cl/SDS, 5,6 ml 30% Acrylamid/ 0,8 % bisacrylamid, 70 μ l 10 % Ammoniumpersulfat, 14 μ l TEMED

4x SDS Ladepuffer: 25 ml 4x Tris-Cl/SDS, 20 ml Glycerol, 4 g SDS, 3,1 g DTT, 1 mg Bromphenolblau, 50 ml H₂O

10x SDS Laufpuffer: 3 g TRIS, 14,4 g Glycin, 1 g SDS, 1 l H₂O

Transferpuffer: 200 ml Methanol, 100 ml 10x SDS Laufpuffer

Blocking-Lösung: 5 % Skimmilk in TBS-T 0,05%

TBS-T 0,05 %: 500 µl Tween-20 in 1 l 1x TBS

TBS: 3,2g Tris-Cl, 8,8 g NaCl, ad 1 L aqua. dest.

2.8 Gallensäurenbehandlung und –extraktion

Die Gallensäurenbehandlung erfolgte 16 Stunden nach Transfektion der HEK293 Zellen mit 25µM der jeweiligen Gallensäure (Sigma). Dazu wurde die Hälfte des Nährmediums pro Well, also 1 ml Nährmedium pro Well abpipettiert und mit dem gleichen Volumen gallensäurehaltiger Nährlösung durch tropfenweises hinzupipettieren ersetzt. Dabei wurde die Schale schräg angestellt, um zu verhindern dass die HEK293 Zellen sich von der Schale ablösen. Die hinzugefügte gallensäurehaltige Nährlösung bestand aus DMEM + 10% deltaBFS mit 50 µM der jeweiligen Gallensäure.

Gallensäurenextraktion wurde wie im folgenden beschrieben durchgeführt: Nach 48-stündiger Gallensäurebehandlung wurde das Nährmedium abpipettiert und 1:3 mit Acetonitril durch Vortexen vermischt um Proteine zu präzipitieren, dann bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in HPLC-Probengefäßen (Agilent 2.0 mL Screwtop HPLC Vials) bei 250° C bei 30 mmHg im Vacuumofen (VWR 1410 Vacuum Oven) über Nacht getrocknet. Den Gefäßen wurde 200µl 25% Methanol hinzupipettiert. Die Extraktionsproben wurden gevortext um darin befindliche Gallensäuren zu resuspendieren.

2.9 HPLC/MS-Detektion

Nach Gallensäurenbehandlung und –extraktion wurden die Extraktionsproben, wie von Lee et al. (2008) beschrieben, analysiert, um Gallensäuren zu quantifizieren. Die Proben wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf eine C8 Presäule (Zorbax C8, 4.6 × 12.5 mm, 5 µm; Agilent) dann auf eine C18 analytische Säule (Eclipse XDB-C18, 4.6 × 50 mm, 5 µm; Agilent) geladen. Als Laufpuffer diente Methanol/0,024% Formic Acid und Wasser/10 mM NH₄Ac/Formic Acid. Die Laufzeit war 30 Minuten. Die Proben wurden mit „electrospray ionisation“ im negativ-Ion Modus analysiert. Die Massenspektrometrie wurde im „selected ion monitoring mode“ (SIM-Modus) durchgeführt. Es wurde nach allen Kombinationen der mono-, di- und tri-hydroxy- und keto-Gallensäuren

ermittelt. Dazu wurde das Agilent 1100 LC System mit G1956B „Single Quadrupole Mass Spectrometer“ und Agilent Chemstation Software verwendet mit simultanem Monitoring folgender Ione: 373, 375, 387, 389, 391, 393, 401, 403, 405, 407, 419. Die Identifizierung der jeweiligen Gallensäure erfolgte anhand von Standardkurven, und die Quantifizierung erfolgte anhand der Peakflächen.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Gallensäuren Substrate muriner AKR1B7 sind. Um dies zu erforschen, wurde *Akr1b7* geklont und AKR1B7 in HEK293 Zellen exprimiert. CRAD2, von dem bekannt war, dass es Gallensäuren umsetzt (Cheng und Russel 2003), wurde ebenfalls in HEK293 Zellen exprimiert. Das Ergebniskapitel ist in drei Teile gegliedert. Der erste Teil beschreibt die Herstellung *Akr1b7* und *Crad2* tragender Plasmide. Der zweite Teil beschreibt die Transfektion der Plasmide in HEK293 Zellen. Der dritte Teil beschreibt HPLC/MS Analyse der Gallensäurenmetabolite AKR1B7 und CRAD2 exprimierender HEK293 Zellen.

3.1 Klonierung *Akr1b7* und CRAD2 tragender Plasmide

Für diese Arbeit wurden die murinen Gene *Akr1b7* und *Crad2* aus cDNA im Rahmen der PCR amplifiziert und jeweils mit den Vektoren pCMX und p3XFLAG-CMV-10 (p3XFLAG), die den CMV-Promoter enthalten, ligiert.

3.1.1 Insert-Herstellung: Amplifikation muriner *Akr1b7* und *Crad2*

Zunächst wurde die RNA aus murinem Nebennierengewebe isoliert und in cDNA revers transkribiert. Dann wurden Amplifikationsprimer mit Restriktionsenzymschnittstellen entworfen, sodass murine *Akr1b7* und *Crad2* Inserts mit *HindIII* und *BamHI* Schnittstellen für die Ligation mit den Vektoren pCMX und p3XFLAG amplifiziert werden konnten.

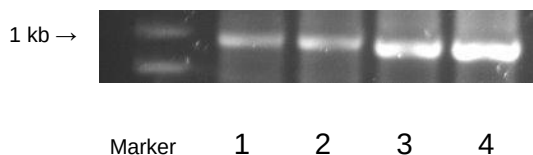


Abb. 3.1: Gelelektrophorese der *Akr1b7*- und *Crad2*-Amplifikationsansätze. *Akr1b7* wurde aus Nebennieren cDNA zur Ligation mit pCMX (Spur 1) und p3XFLAG (Spur 2) amplifiziert. *Crad2* wurde aus dem pCMV-Sport6 Vektor zur Ligation mit pCMX (Spur 3) und p3XFLAG (Spur 4) amplifiziert (repräsentativer Ausschnitt der Gelelektrophorese dargestellt).

Abbildung 3.1 zeigt das Ergebnis der Amplifikation von *Akr1b7* und *Crad2*. Zur *Akr1b7* Amplifikation wurden die Taq DNA Polymerase und 250 ng Nebennieren-cDNA pro Reaktionsansatz bei einer Template-Endkonzentration von 2,5 ng/ μ l und 58°C Annealingtemperatur verwendet. Für jeden Reaktionsansatz wurde ein Upstreamprimer, entweder „5'mAkr1b7-HindIII“ für pCMX als Destinationsvektor, oder „5'mAkr1b7-1-HindIII,,

für p3XFLAG als Destinationsvektor, jeweils mit dem Downstreamprimer "3'Akr1b7-BamHI" verwendet. Crad2 wurde freundlicherweise von Dr. David W. Russell, Department of Molecular Genetics, UTSW, Dallas, USA, im pCMV-Sport6-Crad2 Plasmid zur Verfügung gestellt. Crad2 wurde aus 8 pg Crad2-pCMV-Sport6 pro Reaktionsansatz bei einer Template Endkonzentration von 0,2 pg/µl mithilfe der Taq DNA Polymerase bei 53°C mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden als upstream Primer „5'mCrad2-HindIII“ für den Destinationsvektor pCMX und „5'mCrad2-1-HindIII“ für den Destinationsvektor p3XFLAG verwendet. Der downstream Primer „3'mCrad2-BamHI“ wurde für beide Reaktionsansätze verwendet. Für jede verwendete Primer-Kombination wurde eine negative Kontrollreaktion ohne Template durchgeführt. Um die Amplifikationen zu überprüfen, wurde 10 µl von jedem Reaktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt. Alle Amplifikationsansätze zeigten Banden der erwarteten Größe, etwas unterhalb des 1 kb Markers, als Hinweis auf die erfolgte Amplifikation (Abbildung 3.1, Spur 1-4). Die Kontrollreaktionen waren negativ. Alle Inserts wurde anschließend vor RE-Verdau aus den PCR- Reaktionsansätzen purifiziert.

3.1.2 Restriktionsenzymverdau von pCMX, p3XFLAG, und Akr1b7 und Crad2 tragende Inserts

Zur Vorbereitung auf die Ligation, wurden pCMX und p3XFLAG und Akr1b7 bzw. Crad2 tragende Inserts mit *HindIII* und *BamHI* verdaut. Es wurden jeweils 3,8 µg pCMX und p3XFLAG in jeweils 25 µl Gesamtreaktionsvolumina und von den Inserts jeweils das gesamte Eluat der vorangegangenen Purifizierung in 60 µl Gesamtreaktionsvolumina enzymverdaut. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente erfolgte die Gelaufreinigung der ca. 1 kb großen Banden pro Insert und der 4,6 kb bzw. 6,3 kb Banden von pCMX und p3XFLAG.

3.1.3 Ligation von Akr1b7 und Crad2 mit pCMX und p3XFLAG

HindIII und *BamHI* verdaute Akr1b7- und Crad2- Inserts wurden jeweils mit ebenfalls *HindIII* und *BamHI* verdauten, SAP-behandelten pCMX und p3XFLAG Vektoren als Backbone ligiert. Dazu wurde jeweils ein Ligationsansatz und eine Kontrollreaktion für jeden Inserttyp durchgeführt. Es wurden Ansätze erstellt um folgende Ligationen zu erhalten: Akr1b7-pCMX and Akr1b7-p3XFLAG, Crad2-pCMX, und Crad2-p3XFLAG.

3.1.4 Transformation Akr1b7 und Crad2 tragender Plasmide in DH5alpha Zellen

Thermokompetente E. Coli bakterien vom Typ DH5alpha in 50 µl Aliquoten wurden jeweils mit einem der Ligationen des vorangegangenen Experiments transformiert. Dies erfolgte um Bakterien zu erzeugen, welche folgende Klone produzieren: pCMX-Akr1b7, p3XFLAG-Akr1b7, pCMX-Crad2 und p3XFLAG-Crad2.

3.1.5 Überprüfung der Klone pCMX-Akr1b7, p3XFLAG-Akr1b7, pCMX-Crad2 und p3XFLAG-Crad2

Durch Mini-Plasmidpräparation wurde die Menge der hergestellten Plasmide, pCMX-Akr1b7, p3XFLAG-Akr1b7, pCMX-Crad2 und p3XFLAG-Crad2 erhöht und mittels Restriktionsanalyse verifiziert. Dazu wurden sie mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Bei der anschließenden Gelelektrophorese zeigten sich Banden der gesuchten Vektor- und Insertgröße. Die Abbildung 3.2 zeigt eine Skizze des pCMX-Akr1b7 Plasmids zur Expression von AKRB7 in HEK293 Zellen. In dem Plasmid wird das Akr1b7 Gen von *Hind*III und *Bam*HI Erkennungssequenzen flankiert. Die *Hind*III Erkennungssequenz beginnt an Position 661 und die *Bam*HI Erkennungssequenz an Position 1629 im 5540 bp großem Plasmid, sodass Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ca. 1 kb und 4,6 kb große Plasmidfragmente produziert. Fragmente dieser Größe sind nach entsprechendem Verdau und gelelektrophoretischer Auftrennung in Abbildung 3.2.2 Spur 2 deutlich erkennbar (siehe S. 42). Das pCMX-Crad2 Plasmid zur Expression von CRAD2 in HEK293 Zellen ist in Abbildung 3.2.1 dargestellt. In pCMX-Crad2 flankieren *Hind*III und *Bam*HI Erkennungssequenzen das Crad2 Gen. In dem 5531 bp großen Plasmid beginnt die *Hind*III Erkennungssequenz an Position 661 und die *Bam*HI Erkennungssequenz an Position 1620, sodass Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen ca. 1 kb und 4,6 kb große Plasmidfragmente produziert. Abbildung 3.2.2 Spur 3 lässt diese Plasmidfragmente nach entsprechendem Enzymverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung deutlich erkennen. Abbildung 3.2.2 Spur 1 zeigt den *Bam*HI- und *Hind*III-Verdau des linearisierten 4,6 kb großen pCMX Kontrollvektors zum Vergleich mit den Fragmenten der Insert-tragenden Vektoren der Spuren 2 und 3. Die Abbildung 3.3 (S. 42) zeigt eine Skizze des p3XFLAG-Akr1b7 Plasmids, das genutzt wurde, um Hinweise auf die AKR1B7-Expression in HEK293 Zellen zu erhalten. In p3XFLAG-Akr1b7 wird das Akr1b7 Gen von *Hind*III und *Bam*HI Erkennungssequenzen flankiert. Zwischen dem CMV Promotor und Akr1b7 liegt die Sequenz für das FLAG-Peptid. Das FLAG-Peptid kann im Westernblot immundetektiert werden. Die *Hind*III Erkennungssequenz beginnt an

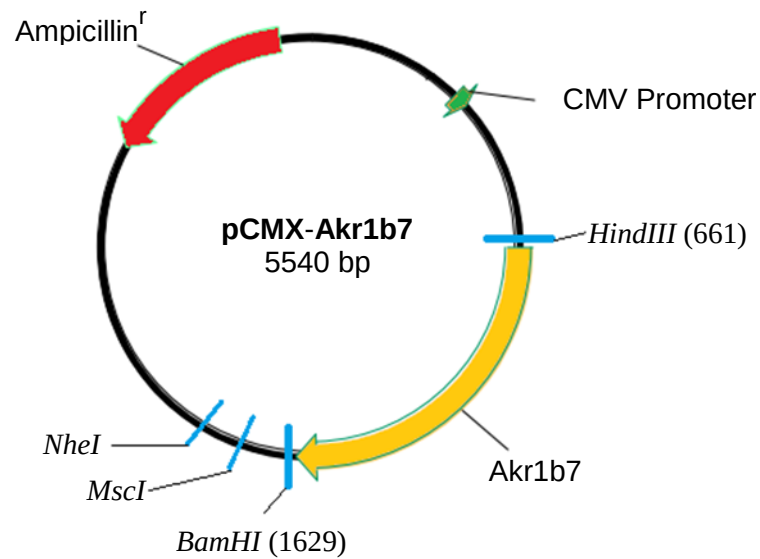


Abbildung 3.2: Skizze des pCMX-Akr1b7 Plasmids zur AKR1B7 Expression in HEK293 Zellen. Akr1b7 wurde mithilfe der Primer „5'mAkr1b7-HindIII“ und „3'Akr1b7-BamHI“ in den pCMX Vektor hineingeklont.

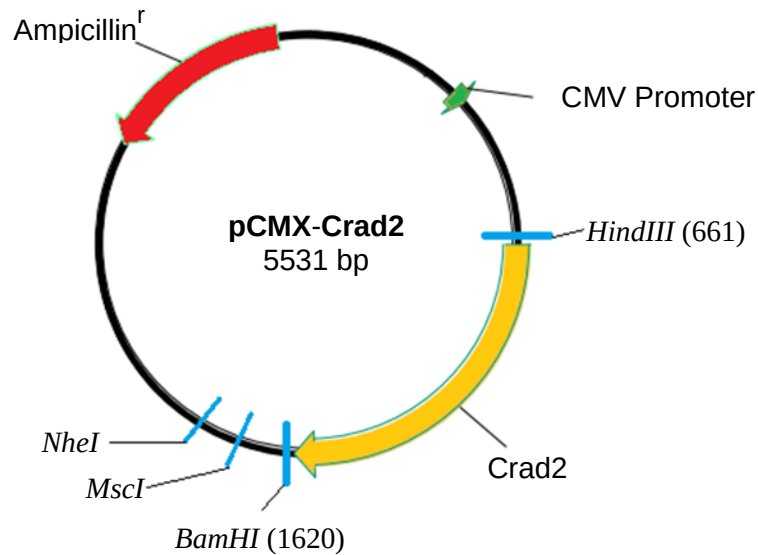


Abbildung 3.2.1: Skizze des pCMX-Crad2 Plasmids zur CRAD2 Expression in HEK293 Zellen. Crad2 wurde mithilfe der Primer „5'mCrad2-HindIII“ und „3'mCrad2-BamHI“ in den pCMX Vektor hineingeklont.

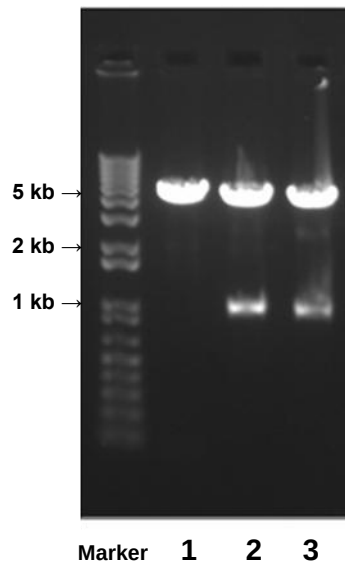


Abbildung 3.2.2: Gelelektrophorese zur Überprüfung der Klone pCMX-Akr1b7 und pCMX-Crad2. Nach Verdau mit *HindIII* und *BamHI* wurden der 4,6 kb große Kontrollvektor pCMX (Spur 1), das pCMX-Akr1b7 Plasmid mit 4,6 kb großem Backbone und ca. 1 kb großem Akr1b7 Insert (Spur 2), und das pCMX-Crad2 Plasmid mit ebenfalls 4,6 kb großem Backbone und ca. 1 kb großem Crad2 Insert (Spur 3) gelelektrophoretisch aufgetrennt.

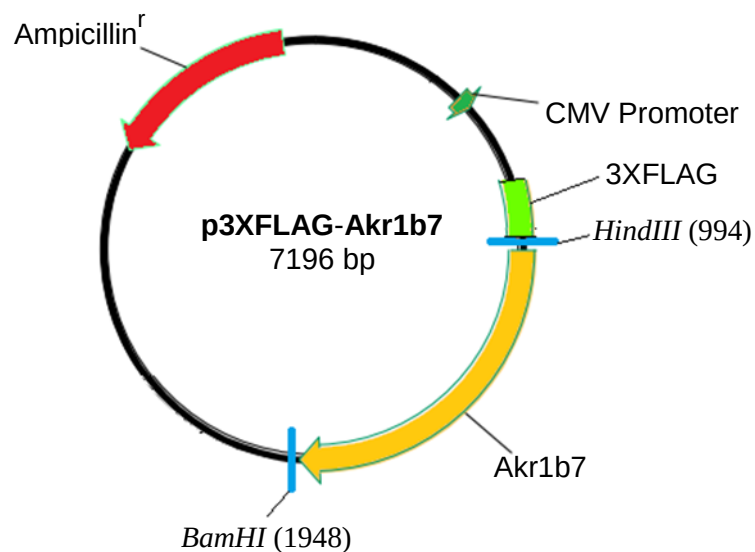


Abbildung 3.3: Skizze des p3XFLAG-Akr1b7 Plasmids zur Überprüfung der AKR1B7 Expression in HEK293 Zellen. Akr1b7 wurde mithilfe der Primer „5'mAkr1b7-1-HindIII„ und “3'Akr1b7-BamHI” in den p3XFLAG-CMV-10 Vektor hineingeklont.

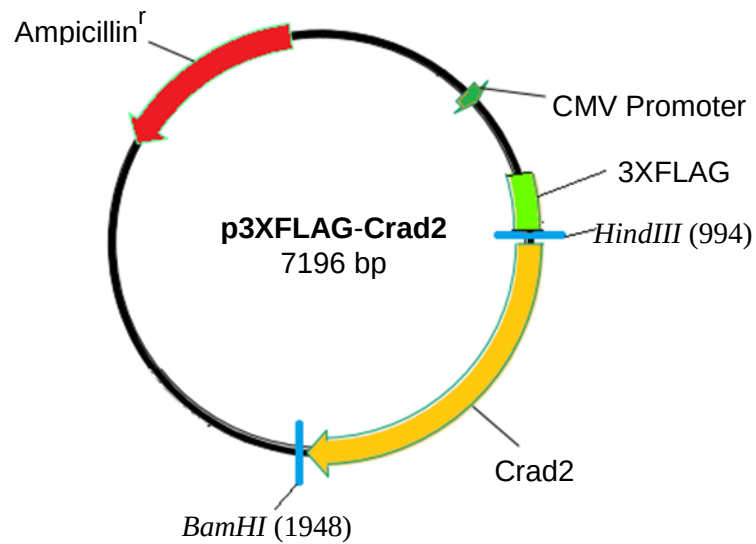


Abbildung 3.3.1: Skizze des p3XFLAG-Crad2 Plasmids zur Überprüfung der CRAD2 Expression in HEK293 Zellen. Crad2 wurde mithilfe der Primer „5'mCrad2-1-HindIII“ und „3'mCrad2-BamHI“ in den p3XFLAG-CMV-10 Vektor hineingeklont.

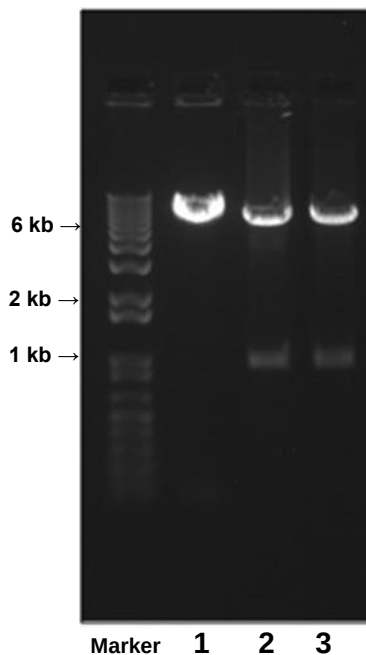


Abbildung 3.3.2: Gelelektrophorese zur Überprüfung der Klone p3XFLAG-Akr1b7 und p3XFLAG-Crad2. Nach Verdau mit *HindIII* und *BamHI* wurden der 6,3 kb große Kontrollvektor p3XFLAG (Spur 1), das p3XFLAG-Akr1b7 Plasmid mit 6,2 kb großem Backbone und ca. 1 kb großem Akr1b7 Insert (Spur 2), und das p3XFLAG-Crad2 Plasmid mit ebenfalls 6,2 kb großem Backbone und ca. 1 kb großem Crad2 Insert (Spur 3) gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Position 994 und die *Bam*HI Erkennungssequenz an Position 1948 im 7,2 kb großem Plasmid, sodass ein Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen ca. 1 kb und 6,2 kb große Plasmidfragmente produziert. Diese Plasmidfragmente sind nach entsprechendem Enzymverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung in Abbildung 3.3.2 Spur 2 deutlich erkennbar. Das p3XFLAG-Crad2 Plasmid zur Überprüfung der Expression von AKRB7 in HEK293 Zellen ist in Abbildung 3.3.1 dargestellt. Auch dieses Plasmid codiert die FLAG Sequenz. In p3XFLAG-Crad2 flankieren *Hind*III und *Bam*HI Erkennungssequenzen das Crad2 Gen. Auch in diesem 7,2 kb großen Plasmid beginnt die *Hind*III Erkennungssequenz an Position 994 und die *Bam*HI Erkennungssequenz an Position 1948, sodass Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen ca. 1 kb und 6,2 kb große Fragmente ergibt. Abbildung 3.3.2 Spur 3 zeigt Plasmidfragmente dieser Größe nach gelelektrophoretischer Auftrennung des p3XFLAG-Crad2-Verdaus mit entsprechenden Enzymen. Zur Kontrolle wurde der 6,3 kb große p3XFLAG Vektor ebenfalls *Hind*III- und *Bam*HI-verdaut. Das Ergebnis der Gelelektrophorese des auf diese Weise linearisierten Vektors zeigt die Abbildung 3.3.2 Spur 1 zum Vergleich mit den Fragmenten der inserttragenden Vektoren in Spuren 2 und 3.

Die Insertregionen wurden aus den Klonen pCMX-Akr1b7, p3XFLAG-Akr1b7, pCMX-Crad2 und p3XFLAG-Crad2 sequenziert und zeigten keine Mutationen. Sequenzierung aus p3XFLAG-Akr1b7, p3XFLAG-Akr1b7 erfolgte mit den selbstentworfenen Sequenzierungsprimern „p3XFLAGfwd“ und „p3XFLAGrev“ (siehe Sequenzierungsprimer). Primer für die Sequenzierung aus pCMX-Akr1b7 und pCMX-Crad2, „pCMXfwd“ beziehungsweise „pCMXrev“, wurden freundlicherweise von Dr. Daniel Schmidt (Department of Pharmacology, UTSW, Dallas, Texas) zur Verfügung gestellt.

3.2 Überprüfen des Proteinexpressions-Assays

Die Proteinexpression wurde mit p3XFLAG-Akr1b7 beziehungsweise p3XFLAG-Crad2 überprüft, welche FLAG-getaggte Akr1b7- beziehungsweise Crad2-Fusionsproteine kodieren. Mittels Westernblot wurde die AKR1B7 und CRAD2 Expression überprüft. Dazu wurden am Vortag der Transfektion 40.000 HEK293 Zellen pro Well auf 5 Wellen einer 6-well Platte in Zellkulturschalen ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Sättigung kultiviert. Jedes der Zellpopulationen wurde mit 2 µg eines der Plasmide pCMX, p3XFLAG, p3XFLAG-Akr1b7, oder p3XFLAG-Crad2 transfektiert.

Die Abbildung 3.4 zeigt den Westernblot der entsprechenden Zellextrakte. Der linke Teil

der Abbildung zeigt die Detektion FLAG-getaggtter Fusionsproteine. Dazu wurde ein monoklonaler Anti-FLAG-Peroxidase Konjugat verwendet. Spur 3 links zeigt die Immundetektion des FLAG-AKR1B7 Fusionsproteins nach Transfektion mit p3XFLAG-Akr1b7. Spur 4 links zeigt die Immundetektion des FLAG-CRAD2 Fusionsproteins nach Transfektion mit p3XFLAG-Crad2. Es wurde kein FLAG Fusionsprotein für die Negativkontrollen pCMX (Spur 1 links) oder p3XFLAG (Spur 2 links) nachgewiesen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, weil pCMX die FLAG-Sequenz nicht codiert, und der p3XFLAG Vektor zwar die FLAG-Sequenz, aber ohne Insert kein Fusionsprotein kodiert. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die β -Actin Ladekontrolle. Dabei wurden ein monoklonaler anti- β -Actin Antikörper aus Maus als Primärantikörper und ein anti-Maus-Peroxidase aus Schaf als Sekundärantikörper verwendet um β -Actin zu detektieren. Die β -Actin Banden sind bei allen Zellpopulationen gleichmäßig stark detektiert.

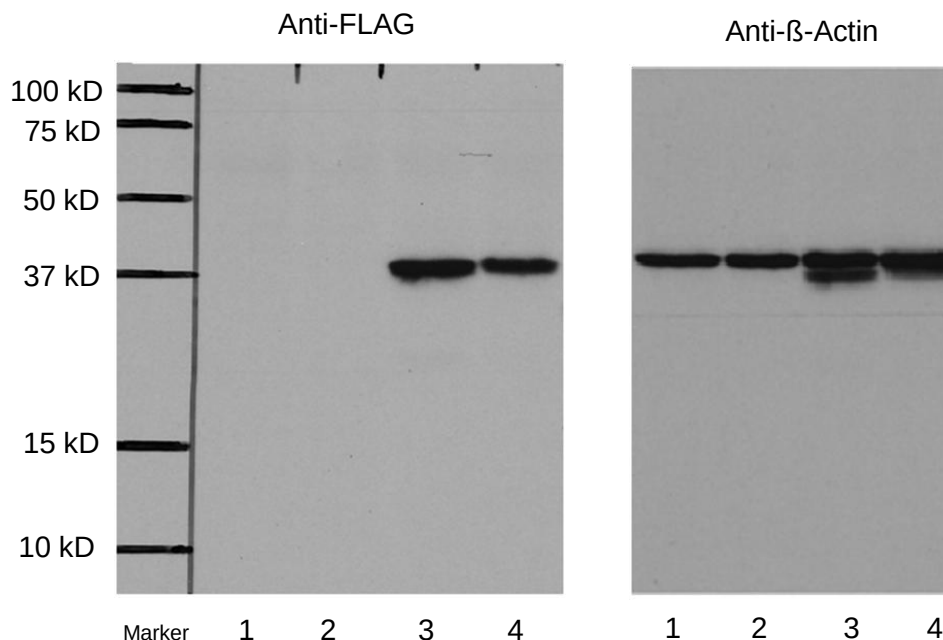


Abbildung 3.4 : Expression FLAG-getaggtter Akr1b7-, und Crad2-Fusionsproteine nach Transfektion mit p3XFLAG-Akr1b7 oder p3XFLAG-Crad2. HEK293-Zellen wurden in verschiedene Zellpopulationen aufgeteilt und jeweils mit 2 μ g eines Plasmids transfektiert. Die Plasmide waren pCMX (Spur 1), p3XFLAG (Spur 2), p3XFLAG-Akr1b7 (Spur 3), p3XFLAG-Crad2 (Spur 4). Zur Detektion FLAG-getaggtter Fusionsproteine wurde ein monoklonaler Anti-FLAG-Peroxidase Konjugat verwendet (Abb. links). Zur Ladekontrolle wurde ein monoklonaler anti- β -Actin Antikörper aus Maus als Primärantikörper und ein anti-Maus-Peroxidase aus Schaf als Sekundärantikörper verwendet um β -Actin zu detektieren. (Abb. rechts).

Bei nachfolgenden Transfektionen zur Analyse der Proteinexpression wurden nur noch pCMX-Akr1b7 beziehungsweise pCMX-Crad2 eingesetzt, um HEK293 Zellen zu erhalten welche AKR1B7 beziehungsweise CRAD2 ohne FLAG-Peptid exprimieren.

3.3 LC/MS-Analyse des Kulturmediums Gallensäure-behandelter, Akr1b7-exprimierender HEK293 Zellen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass AKR1B7 in HEK293 Zellen exprimiert wird. Dieser Abschnitt beantwortet die Kernfrage, ob, beziehungsweise welche Gallensäuren Substrate von AKR1B7 sind.

Für jede der im Folgenden beschriebenen Transfektionen wurden am Vortag jeweils 40.000 HEK293 Zellen pro Well auf 6-well Platten in Zellkulturschalen ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Sättigung kultiviert. Transfektion erfolgte mit insgesamt 2 µg Plasmid pro Well bei einer Konfluenz von ca. 50 %. Es erfolgte eine Gallensäurenbehandlung 16 Stunden nach Transfektion der HEK293 Zellen mit 25µM der jeweiligen Gallensäure. Aus jedem Well wurde Zellkulturmedium 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Extrakte wurden durch HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Es wurde die Bildung der mono- di- und tri-hydroxy- und Keto-Gallensäuren untersucht. Die Abbildungen 3.5 bis 3.17 zeigen die massenspektrometrischen Ergebnisse der Quantifizierung der Gallensäuren. Im Folgenden werden die massenspektrometrischen Ergebnisse dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse wurde bereits in Schmidt et al. (2011) publiziert.

3.3.1 Substrate der AKR1B7

3-Keto-5β-Cholansäure (3-Keto-LCA)

Die Abbildung 3.5 „Akr1b7 metabolisiert 3-Keto-LCA zu 3β-hydroxy-LCA“ (siehe nächste Seite) zeigt den Effekt von AKR1B7 auf 3-Keto-5β-Cholansäure (3-Keto-LCA). HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.5.C) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.5 B) und mit 25 µM 3-Keto-LCA in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob 3-Keto-LCA ein Substrat von AKR1B7 ist.

Im Extrakt des 3-Keto-LCA-haltigen Kulturmediums (Abb.3.5 A) ohne Zelleinfluss wurde 3-Keto-LCA wie erwartet detektiert. Im Mediumextrakt der Kontrollzellen (Abb.3.5 B) wurde

3 α -5 β -Hydroxyd-Cholansäure (LCA) zusätzlich zur Substratgallensäure 3-Keto-LCA detektiert. Im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.5.C) wurden 3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure (3 β -LCA), und jeweils weniger LCA und 3-Keto-LCA im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen detektiert.

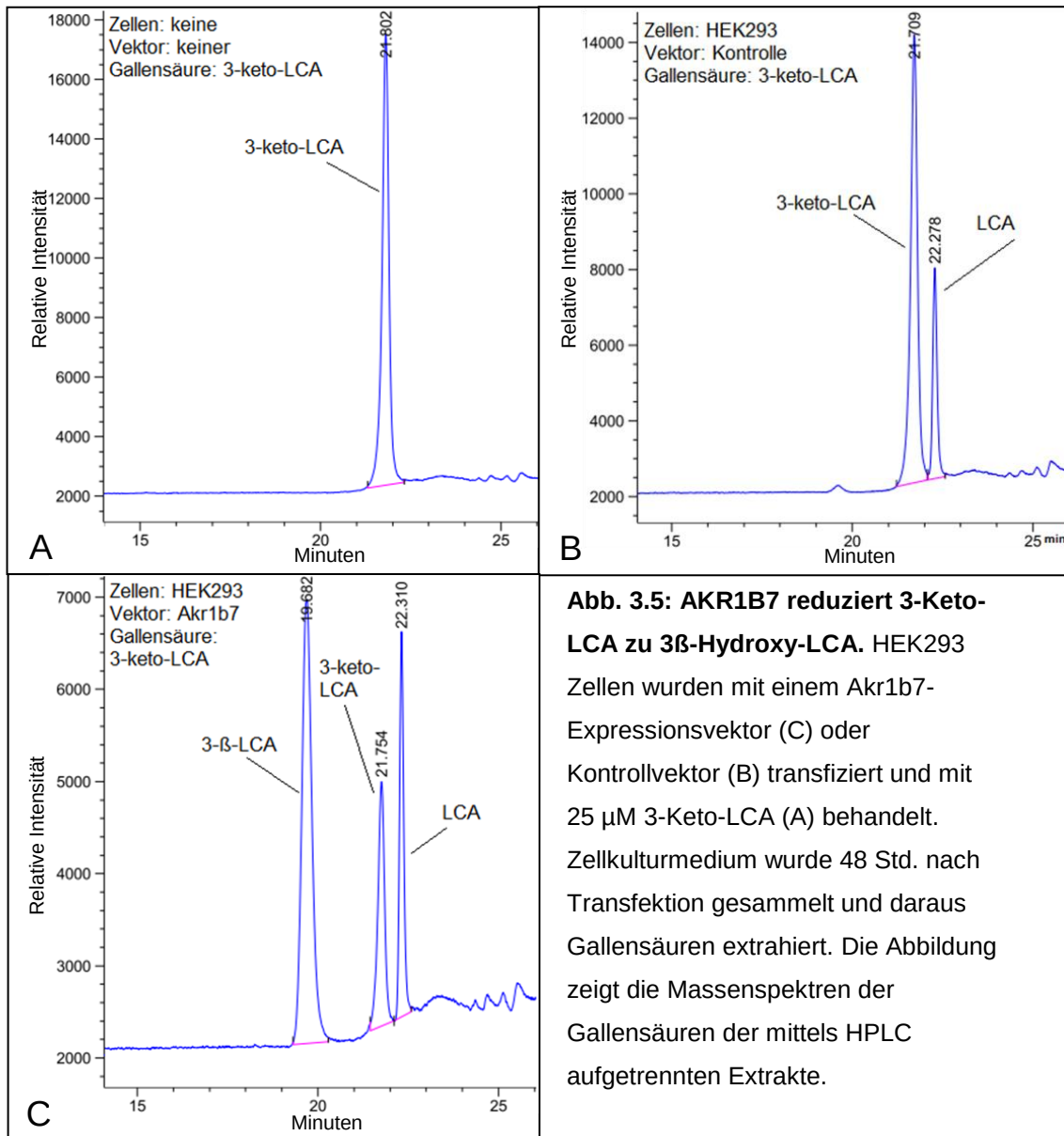


Abb. 3.5: AKR1B7 reduziert 3-Keto-LCA zu 3 β -Hydroxy-LCA. HEK293

Zellen wurden mit einem Akr1b7-Expressionsvektor (C) oder Kontrollvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3-Keto-LCA (A) behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

3,6 Diketo-5 β -Cholansäure

Die Abbildung 3.6 „AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure“ verdeutlicht den Effekt von AKR1B7 auf 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure. HEK293-Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.6.C) oder dem

Kontrollvektor pCMX transfektiert (Abb.3.6 B) und mit 25 μ M 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure in Kulturmedium (Abb.3.6 A) behandelt um zu prüfen, ob AKR1B7 diese Gallensäure verstoffwechselt. Im Extrakt des 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure-haltigen Kulturmediums (Abb.3.6 A) ohne Zelleinfluss wurde 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure detektiert. Im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen (Abb.3.6 B) wurde außer der Substratgallensäure 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure weniger 3 β -Hydroxy-6-keto-5 β -Cholansäure als 3 α -6-Keto-5 β -Cholansäure detektiert. Im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.6 C) wurde mehr 3 β -Hydroxy-6-keto-5 β -Cholansäure dafür jeweils weniger 3 α -Hydroxy-6-keto-5 β -Cholansäure und 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure als im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen detektiert. Weil es auch in der Abbildung 3.6

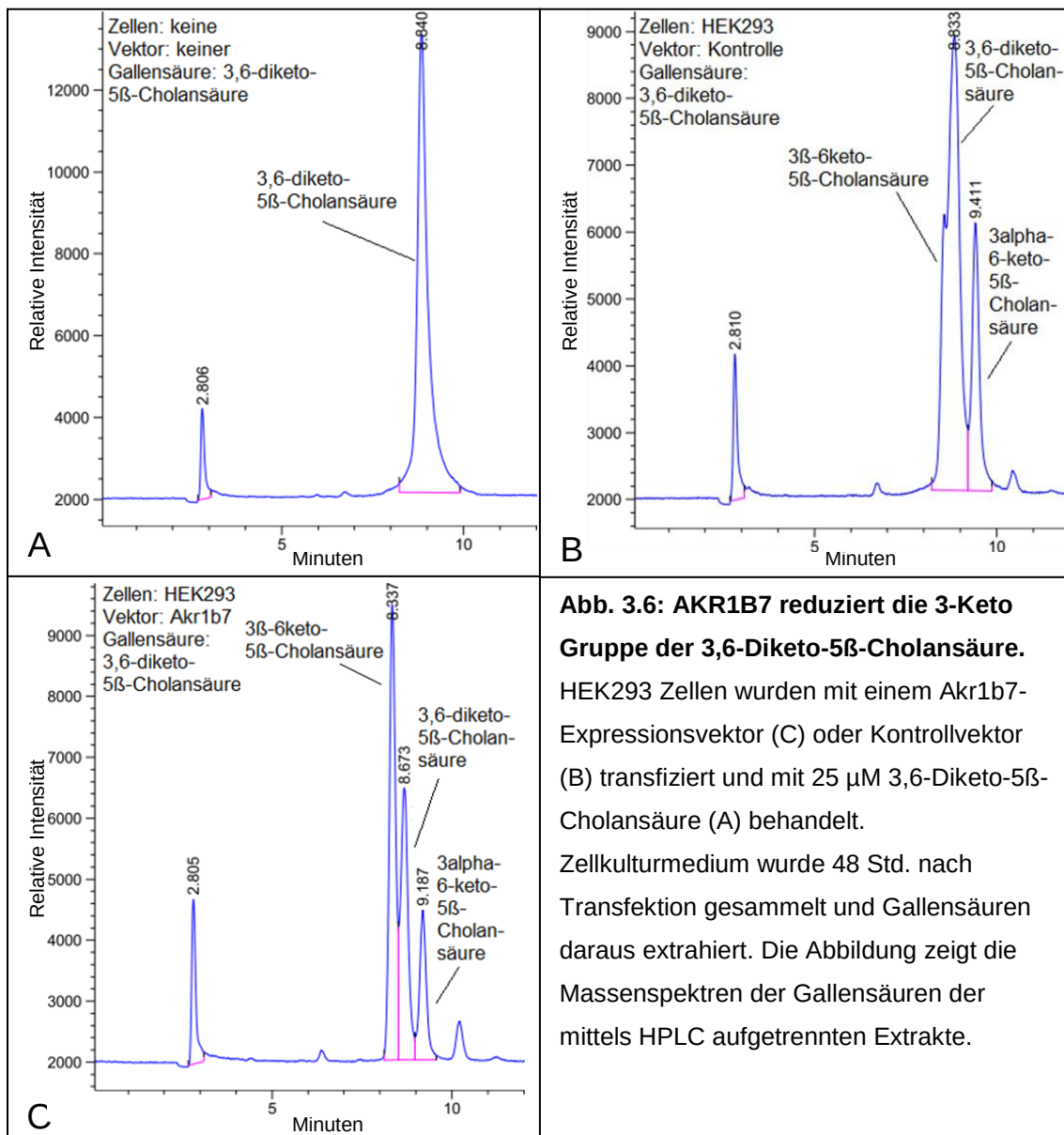


Abb. 3.6: AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure.

HEK293 Zellen wurden mit einem Akr1b7-Expressionsvektor (C) oder Kontrollvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3,6-Diketo-5 β -Cholansäure (A) behandelt.

Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und Gallensäuren daraus extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

sichtbar ist, wird an dieser Stelle erwähnt, dass es sich in allen Abbildungen bei den Peaks mit der Retentionszeit ca. 2,8 Minuten um das Lösungsmittel 25% Methanol handelt, in dem die Kulturmediumextrakte resuspendiert wurden.

3,7-Diketo-5 β -Cholansäure

Die Abbildung 3.7 „AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure“ zeigt den Effekt von AKR1B7 auf 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.7.C) oder dem Kontrollvektor pCMX transfektiert (Abb.3.7 B) und mit 25 μ M 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure in Kulturmedium

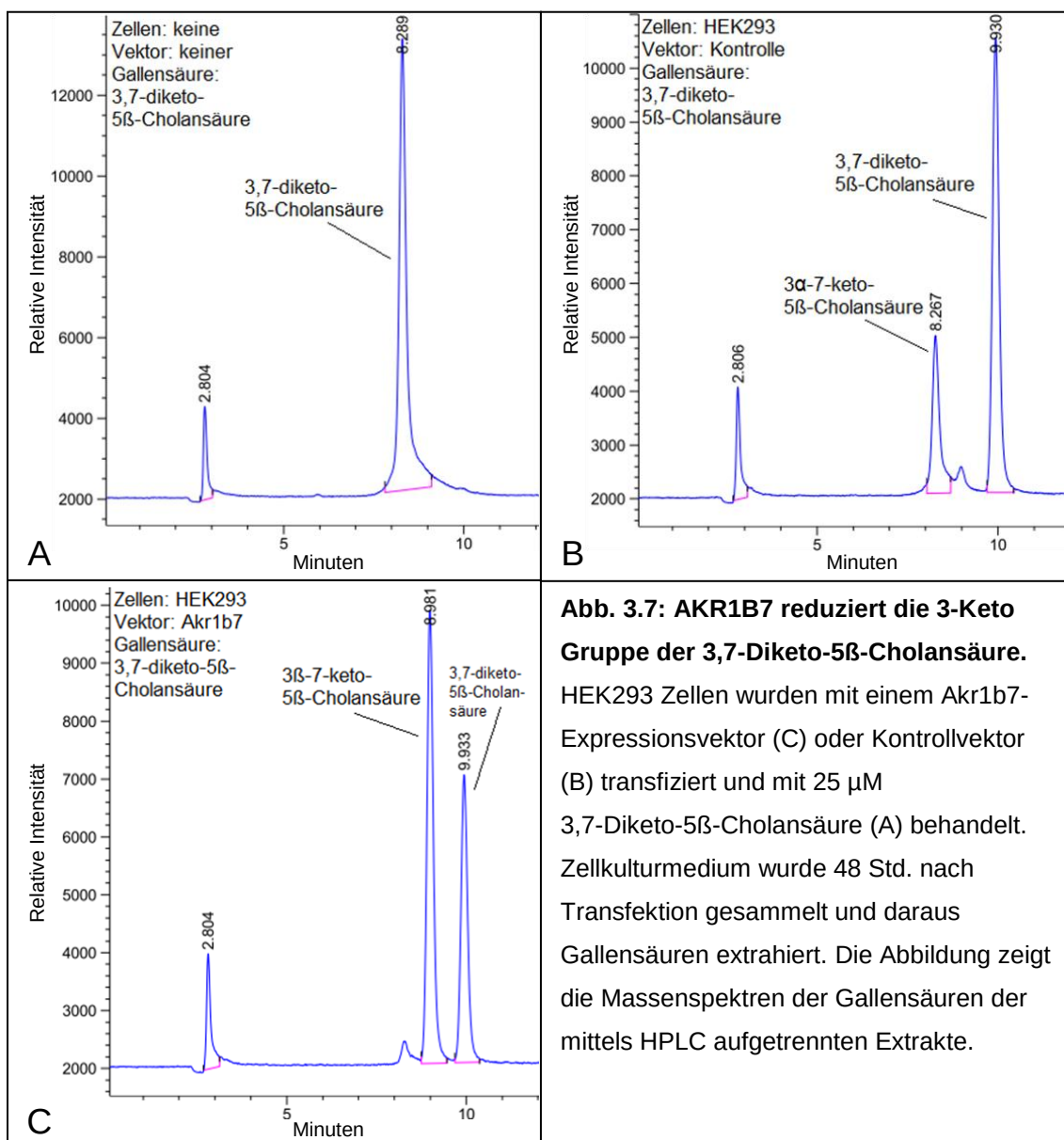


Abb. 3.7: AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure.

HEK293 Zellen wurden mit einem Akr1b7-Expressionsvektor (C) oder Kontrollvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure (A) behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

(Abb.3.7 A) behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure von AKR1B7 umgesetzt wird. Wie erwartet, zeigte die Gallensäuredetektion des 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure-haltigen Kulturmediumextrakts (Abb.3.7 A) ohne Zelleinfluss 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure. Im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen (Abb.3.7 B) wurde außer 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure auch 3 α -Hydroxy-7-keto-5 β -Cholansäure detektiert. Im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.7 C) dagegen, ließ sich 3 β -Hydroxy-7-keto-5 β -Cholansäure neben 3,7-Diketo-5 β -Cholansäure aber keine 3 α -Hydroxy-7-keto-5 β -Cholansäure detektieren.

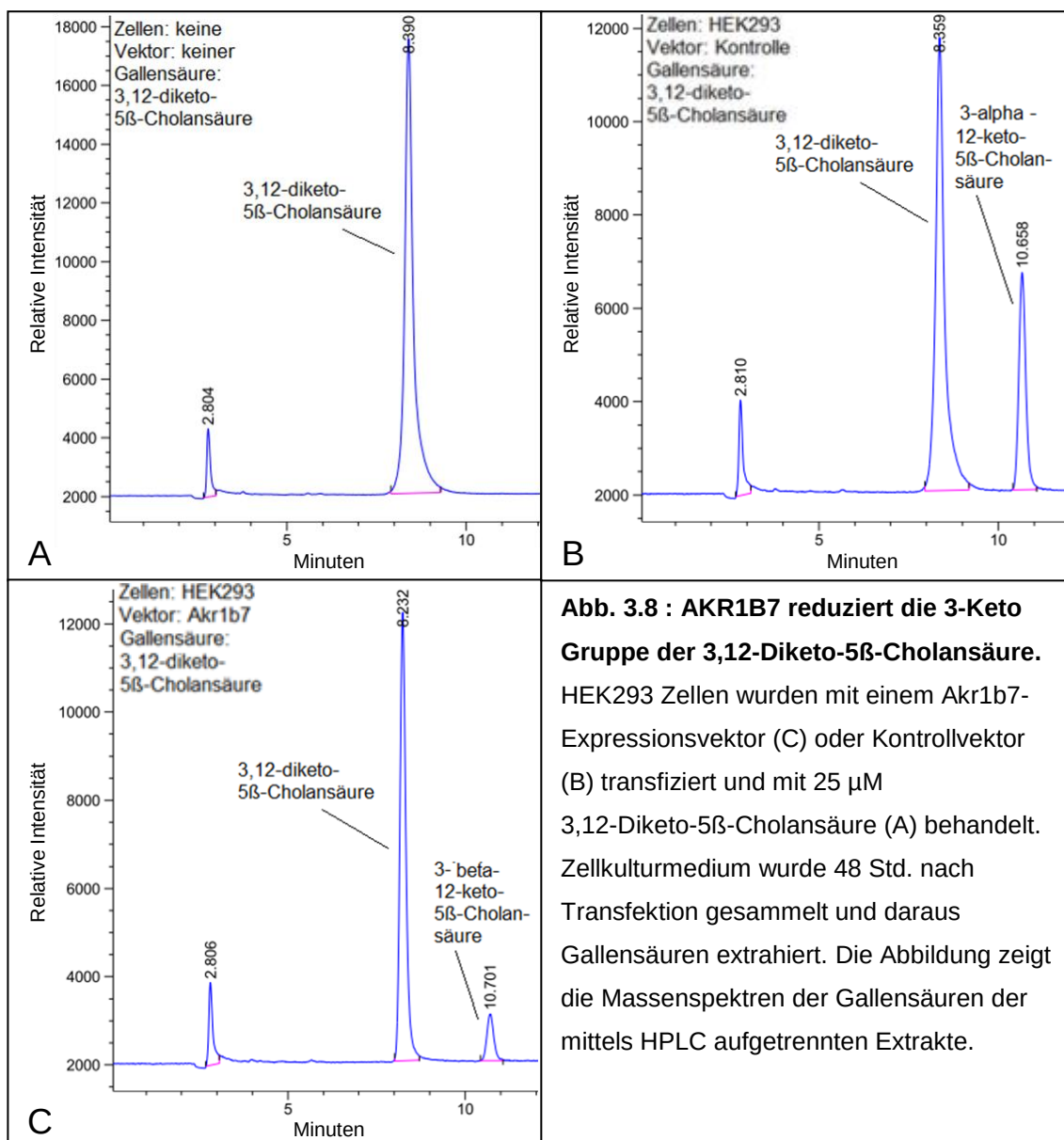


Abb. 3.8 : AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure.

HEK293 Zellen wurden mit einem Akr1b7-Expressionsvektor (C) oder Kontrollvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure (A) behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

3,12-diketo-5 β -Cholansäure

Die Abbildung 3.8 „AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure“ stellt den Effekt von AKR1B7 auf 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure dar. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.8 C) oder dem Kontrollvektor pCMX transfektiert (Abb.3.8 B) und mit 25 μ M 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure in Kulturmedium (Abb.3.8 A) behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure von AKR1B7 umgesetzt wird. Im Extrakt des 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure-haltigen Kulturmediums (Abb.3.8 A) ohne Zelleinfluss wurde 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure, wie erwartet, detektiert. Im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen (Abb.3.8 B) wurde neben 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure auch 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure detektiert. Dagegen wurde im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.8 C) außer 3,12-Diketo-5 β -Cholansäure 3 β -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure aber keine 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure detektiert.

3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure

Die Abbildung 3.9 „AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure“ zeigt den Effekt von AKR1B7 auf 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.9 C) oder dem Kontrollvektor pCMX transfektiert (Abb.3.9 B) und mit 25 μ M 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure in Kulturmedium (Abb.3.9 A) behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure ein Substrat von AKR1B7 ist.

Wie erwartet wurde im Kulturmediumextrakt des 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure-haltigen Kulturmediums (Abb.3.9 A) ohne Zelleinfluss die 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure detektiert. Im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen (Abb.3.9 B) wurde außer 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure auch 3 β -7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholansäure detektiert. Im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.9 C) wurde neben 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure mehr 3 β -7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholansäure detektiert als im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen.

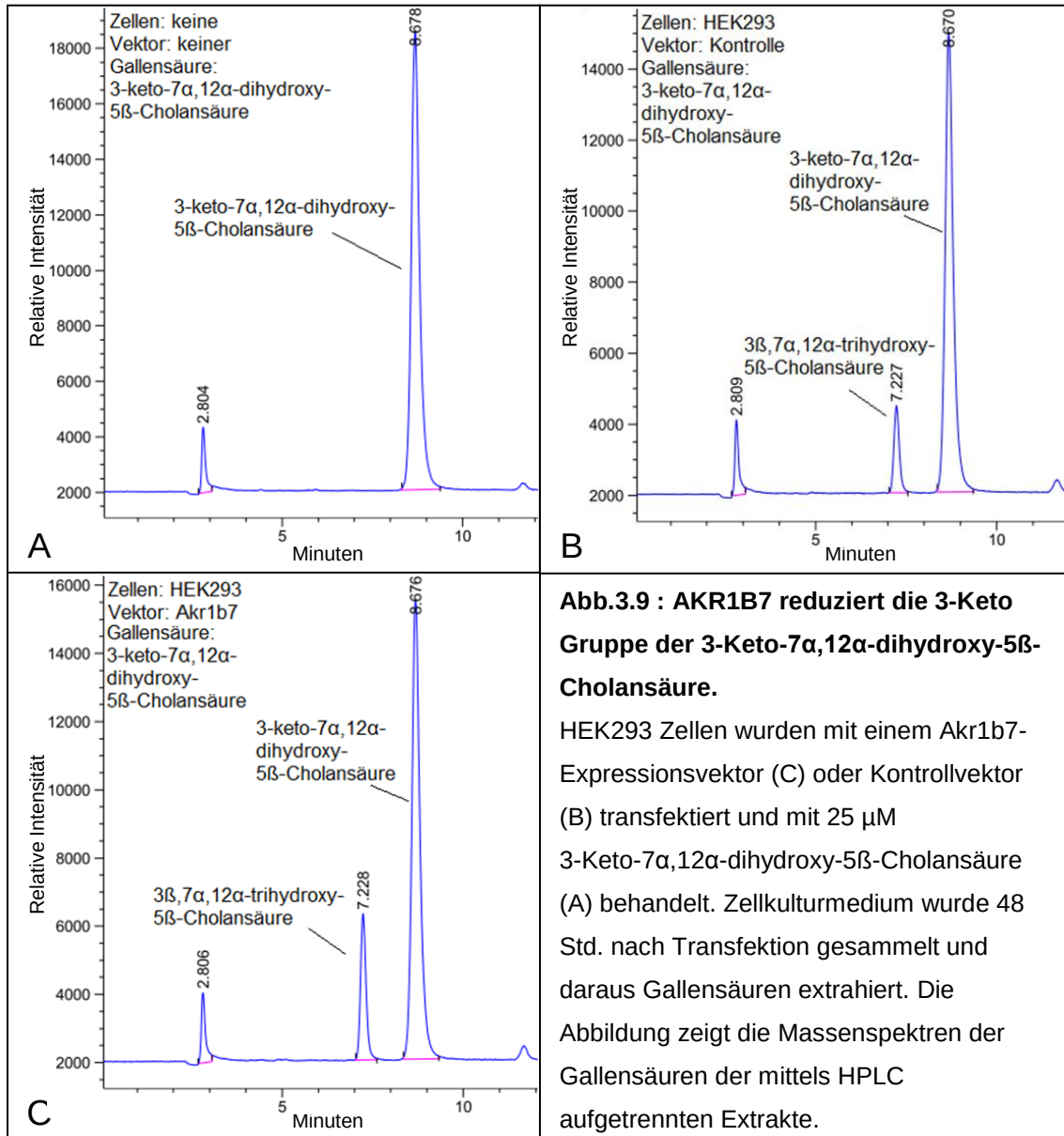


Abb.3.9 : AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure.

HEK293 Zellen wurden mit einem Akr1b7-Expressionsvektor (C) oder Kontrollvektor (B) transfektiert und mit 25 μ M 3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure (A) behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

3,7,12-triketo-5 β -Cholansäure

Die Abbildung 3.10 „AKR1B7 reduziert die 3-Keto Gruppe der 3,7,12-triketo-5 β -Cholansäure“ stellt den Effekt von AKR1B7 auf 3,7,12-Triketo-5 β -Cholansäure dar. Es wurden HEK293 Zellen mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.10 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.10 A) und mit 25 μ M 3,7,12-Triketo-5 β -Cholansäure in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure von AKR1B7 umgesetzt wird. Im Kulturmediumextrakt der Kontrollzellen (Abb.3.10 A) wurde ausser 3,7,12-Triketo-5 β -Cholansäure auch 3 β -Hydroxy-7,12-diketo-5 β -Cholansäure

detektiert. Im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.10 B) wurde deutlich weniger 3,7,12-Triketo-5 β -Cholansäure und mehr 3 β -Hydroxy-7,12-diketo-5 β -Cholansäure im Vergleich zur Kontrolle detektiert.

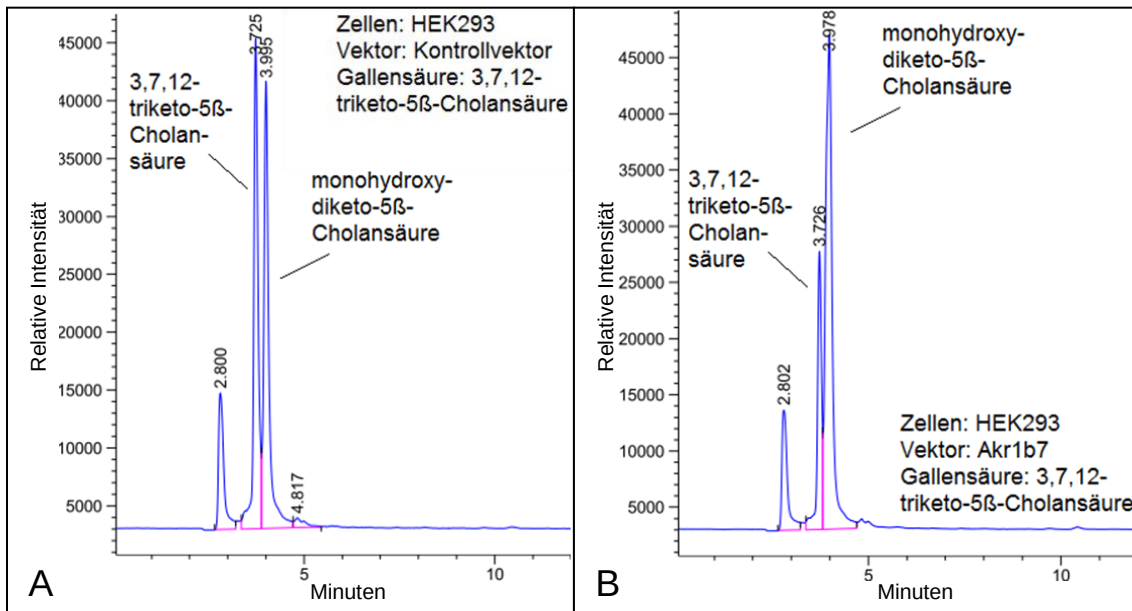


Abb. 3.10: AKR1B7 reduziert eine Ketogruppe der 3,7,12-Triketo-5 β -Cholansäure.

HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3,7,12-Triketo-5 β -Cholansäure behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

3-Keto-7 α -hydroxy-5 β -Cholansäure (3-Keto-CDCA)

Die Abbildung 3.10.1 „AKR1B7 reduziert 3-Keto-CDCA zu 3 β -CDCA“ zeigt den Effekt von AKR1B7 auf 3-Keto-7 α -hydroxy-5 β -Cholansäure (3-Keto-CDCA) und CDCA und von CRAD2 auf CDCA. HEK293 Zellen wurden mit pCMX-Akr1b7 (Abb.3.10.1 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.10.1 A) und mit 25 μ M 3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure (CDCA) in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob CDCA von AKR1B7 verstoffwechselt wird. In den Kulturmediumextrakten der Kontrollzellen (Abb.3.10.1 A) wurde CDCA wie erwartet detektiert. Im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.10.1 B) wurde ebenfalls CDCA ohne Metabolite detektiert.

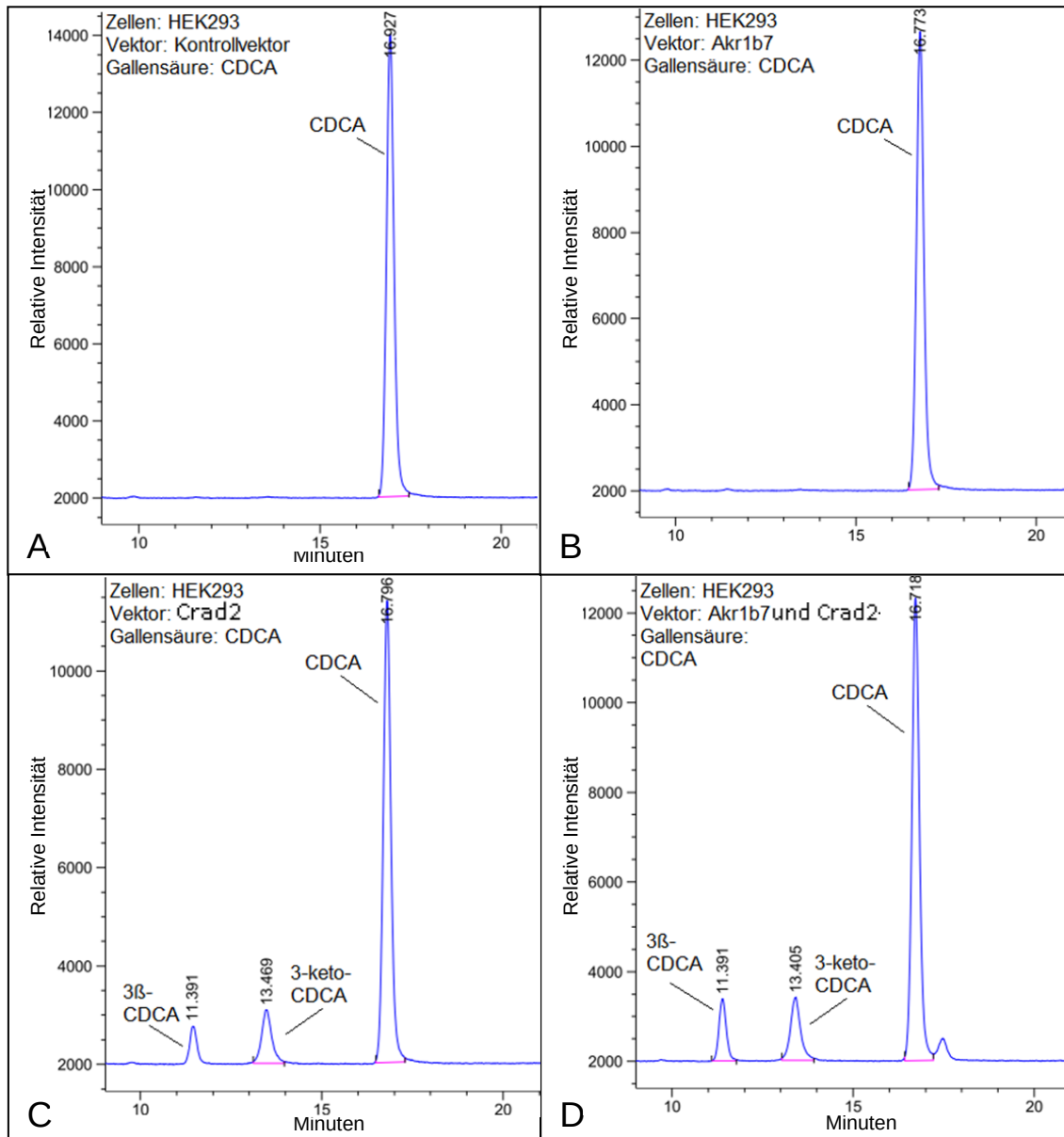


Abb. 3.10.1: AKR1B7 reduziert 3-Keto-CDCA zu 3β-CDCA. HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A) oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) oder Crad2-Expressionsvektor (C) transfiziert, oder mit Akr1b7-Expressionsvektor und Crad2-Expressionsvektor (D) cotransfiziert. Alle Zellpopulationen wurden mit 25 µM 3α,7α-Dihydroxy-5β-Cholansäure (CDCA) behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

Von CRAD2 war bekannt, dass es die 3α-Hydroxygruppe einiger Gallensäuren oxidiert (Cheng und Russel 2003). Weil 3-Keto-CDCA nicht käuflich erwerbbar war, wurde geprüft ob CRAD2 CDCA zu 3-Keto-CDCA umsetzt. Dazu wurden HEK293 Zellen mit pCMX-

Crad2 transfektiert (Abb.3.10.1 C) und mit 25 μ M CDCA in Kulturmedium behandelt. Es wurden 3-Keto-CDCA, CDCA und etwas 3 β -7 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure (3 β -CDCA) im Kulturmediumextrakt CRAD2-exprimierender Zellen (Abb.3.10.1 C) detektiert.

CRAD2 wurde verwendet um 3-Keto-CDCA zu produzieren, damit geprüft werden konnte, ob AKR1B7 3-Keto-CDCA umsetzt. HEK293 Zellen wurden dazu mit den Akr1b7- und Crad2-Expressionsvektoren pCMX-Akr1b7 und pCMX-Crad2 cotransfiziert (Abb.3.10.1 D) und mit 25 μ M CDCA in Kulturmedium behandelt. Im Kulturmediumextrakt AKR1B7- und CRAD2-exprimierender Zellen (Abb.3.10.1 D) wurde neben CDCA verhältnismäßig mehr 3 β -CDCA gegenüber 3-Keto-CDCA als im Kulturmediumextrakt der CRAD2-exprimierenden Zellen detektiert.

3-Keto-12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure (3-Keto-DCA)

Die Abbildung 3.10.2 „AKR1B7 reduziert 3-Keto-DCA zu 3 β -DCA“ verdeutlicht den Effekt von AKR1B7 auf 3-Keto-12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure (3-Keto-DCA) und DCA und von CRAD2 auf DCA. HEK293 Zellen wurden mit pCMX-Akr1b7 (Abb.3.10.2 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.10.2 A) und mit 25 μ M 3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure (DCA) in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob DCA von AKR1B7 umgesetzt wird. In den Kulturmediumextrakten der Kontrollzellen (Abb.3.10.2 A) wurde DCA wie erwartet detektiert. Im Kulturmediumextrakt der AKR1B7 exprimierenden Zellen (Abb.3.10.2 B) wurde ebenfalls DCA ohne Metabolite detektiert. Weil 3-Keto-DCA nicht käuflich erwerbbar war, wurde überprüft ob CRAD2 DCA zu 3-Keto-CDCA umsetzt. Dazu wurden HEK293 Zellen mit pCMX-Crad2 transfektiert (Abb.3.10.2 C) und mit 25 μ M DCA in Kulturmedium behandelt. Im Kulturmediumextrakt CRAD2-exprimierender Zellen (Abb.3.10.2 C) wurde mehr 3-Keto-DCA als 3 β -7 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure (3 β -DCA) neben DCA detektiert. Damit geprüft werden konnte ob AKR1B7 3-Keto-DCA umsetzt, wurde CRAD2 verwendet um 3-Keto-DCA zu produzieren. HEK293 Zellen wurden dazu mit den Akr1b7- und Crad2-Expressionsvektoren pCMX-Akr1b7 und pCMX-Crad2 kotransfiziert (Abb.3.10.2 D) und mit 25 μ M DCA in Kulturmedium behandelt. Im Kulturmediumextrakt AKR1B7- und CRAD2-exprimierender Zellen (Abb.3.10.2 D) wurde viel weniger DCA, deutlich mehr 3 β -DCA gegenüber deutlich weniger 3-Keto-DCA als im Kulturmediumextrakt der CRAD2-exprimierenden Zellen detektiert.

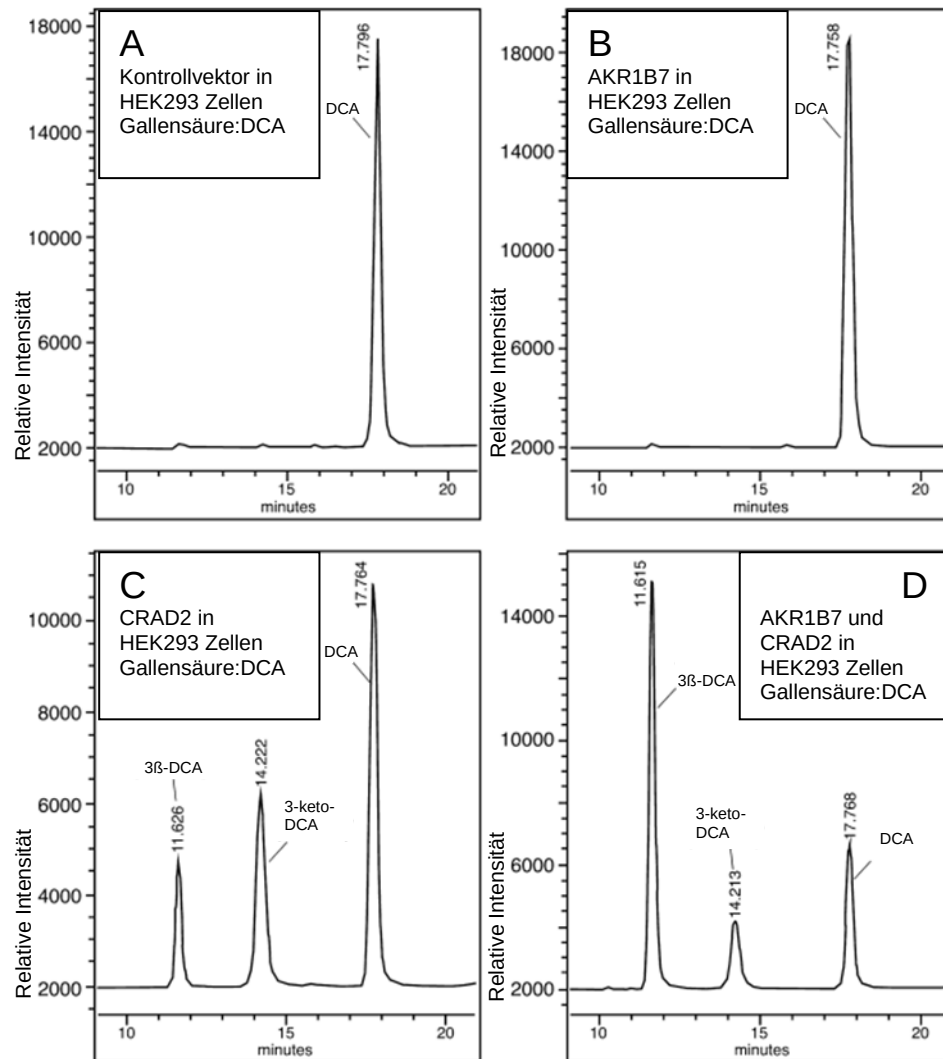


Abb. 3.10.2: AKR1B7 reduziert 3-Keto-DCA zu 3β-DCA. HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A) oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) oder Crad2-Expressionsvektor (C) transfiziert, oder mit Akr1b7-Expressionsvektor und Crad2-Expressionsvektor (D) cotransfiziert. Alle Zellpopulationen wurden mit 25 μ M 3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure (DCA) behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte. (Adaptiert aus Schmidt et al. 2011)

3.3.2 Nicht umgesetzte Substrate der AKR1B7

3 α -Hydroxy-5 β -Cholansäure (LCA)

Die Abbildung 3.11 „AKR1B7 metabolisiert 3 α -Hydroxy-5 β -Cholansäure (LCA) nicht.“ stellt den Effekt von AKR1B7 auf LCA dar. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.11 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert

(Abb.3.11 A) und mit 25 μ M LCA in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure ein Substrat von AKR1B7 ist. Im Kulturmediumextrakt beider Zellpopulationen wurde LCA ohne Gallensäuremetabolite detektiert.

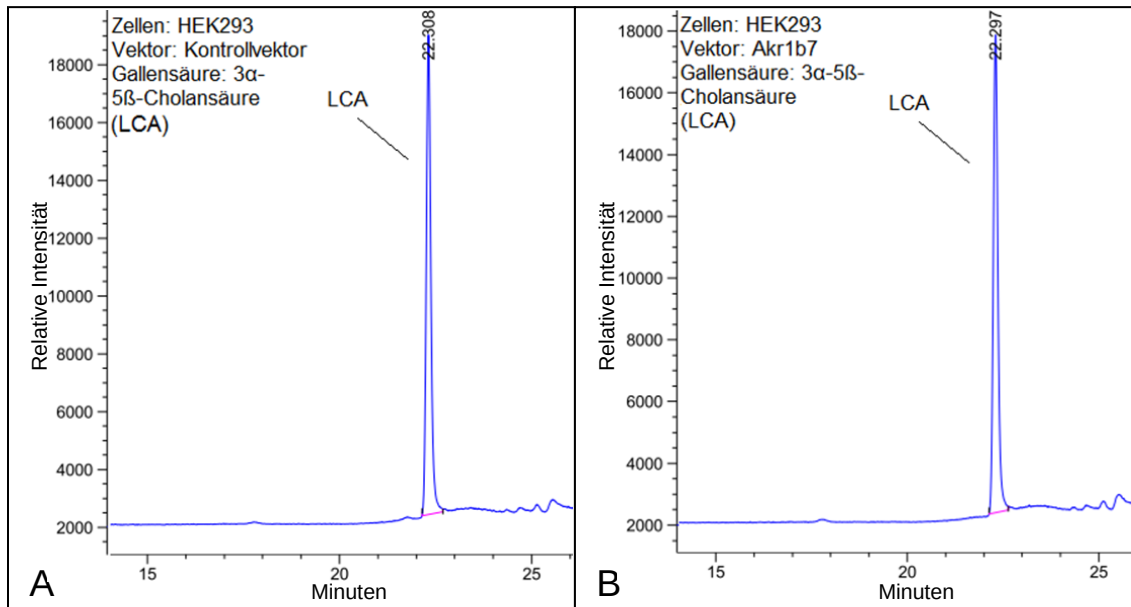


Abb. 3.11: AKR1B7 metabolisiert 3 α -hydroxy-5 β -Cholansäure (LCA) nicht.

HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3 α -Hydroxy-5 β -Cholansäure behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure (CDCA)

Das Ergebnis der Prüfung, ob CDCA ein Substrat von AKR1B7 ist, wird oben im Text angegeben. (Siehe 3-Keto-7 α -hydroxy-5 β -Cholansäure)

3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure (DCA)

Auch das Ergebnis der Prüfung, ob DCA von AKR1B7 umgesetzt wird, ist oben im Text angegeben. (Siehe 3-Keto-12 α -hydroxy-5 β -Cholansäure)

3 α ,7 α -12 α -Trihydroxy-5 β -Cholansäure (CA)

Die Abbildung 3.12 „AKR1B7 metabolisiert 3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholansäure nicht“ zeigt den Effekt von AKR1B7 auf 3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholansäure (CA). HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.12 B) oder dem

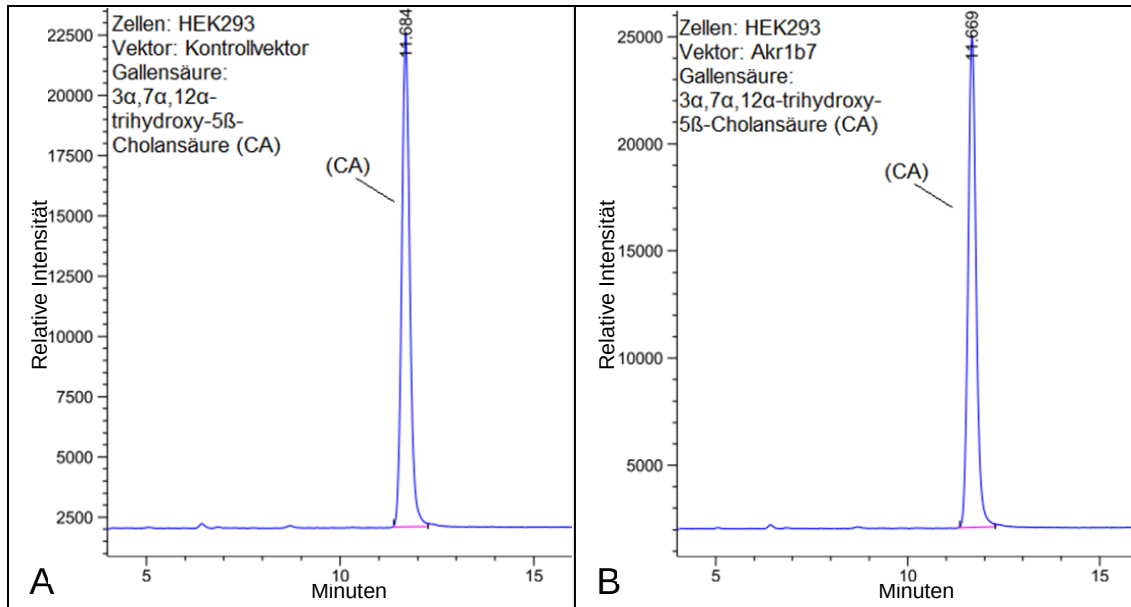


Abb. 3.12: AKR1B7 metabolisiert 3α,7α,12α-Trihydroxy-5β-Cholansäure nicht. HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μM 3α,7α,12α-trihydroxy-5β-Cholansäure (CA) behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.12 A) und mit 25 μM 3α,7α,12α-Trihydroxy-5β-Cholansäure in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen, ob diese Gallensäure ein Substrat von AKR1B7 ist. CA wurde ohne Gallensäurenmetabolite im Kulturmediumextrakt beider Zellpopulationen detektiert.

3α-Hydroxy-6-keto-5β-Cholansäure

Die Abbildung 3.13 „AKR1B7 metabolisiert 3α-Hydroxy-6-keto-5β-Cholansäure nicht“ verdeutlicht den Effekt von AKR1B7 auf 3α-Hydroxy-6-keto-5β-Cholansäure. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.13 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.13 A) und mit 25 μM 3α-Hydroxy-6-keto-5β-Cholansäure in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure ein Substrat von AKR1B7 ist. Im Kulturmediumextrakt beider Zellpopulationen wurde 3α-Hydroxy-6-keto-5β-Cholansäure ohne Gallensäuremetabolite detektiert.

3α-Hydroxy-7-keto-5β-Cholansäure

Die Abbildung 3.14 „AKR1B7 metabolisiert 3α-Hydroxy-7-keto-5β-Cholansäure nicht“ zeigt den Effekt von AKR1B7 auf 3α-Hydroxy-7-keto-5β-Cholansäure. HEK293 Zellen wurden

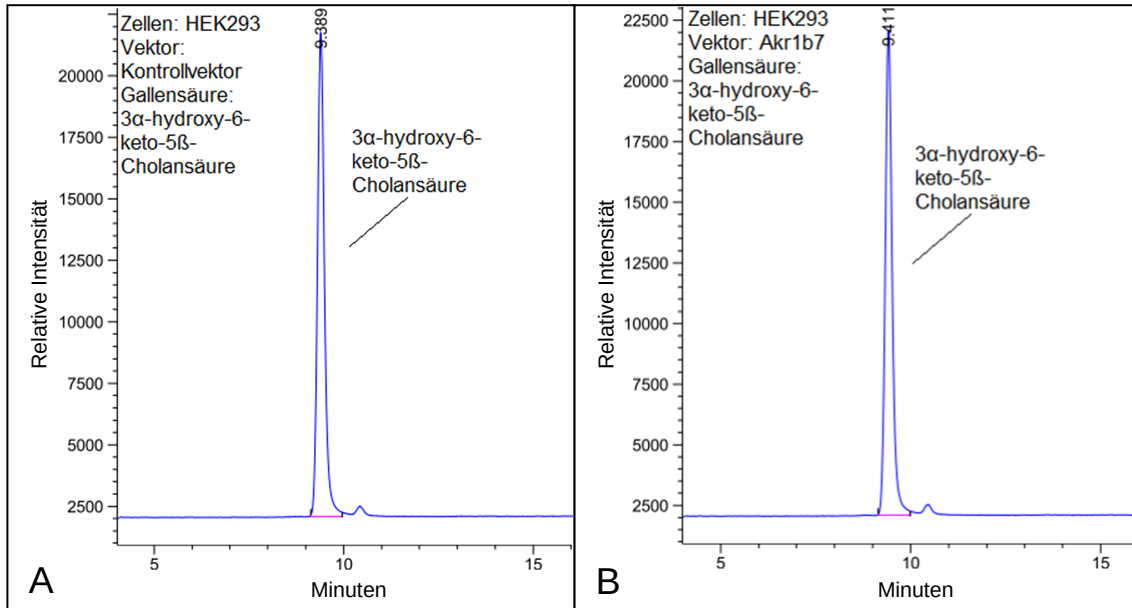


Abb. 3.13: AKR1B7 metabolisiert 3α-Hydroxy-6-keto-5β-Cholansäure nicht.

HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3α-Hydroxy-6-keto-5β-Cholansäure behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

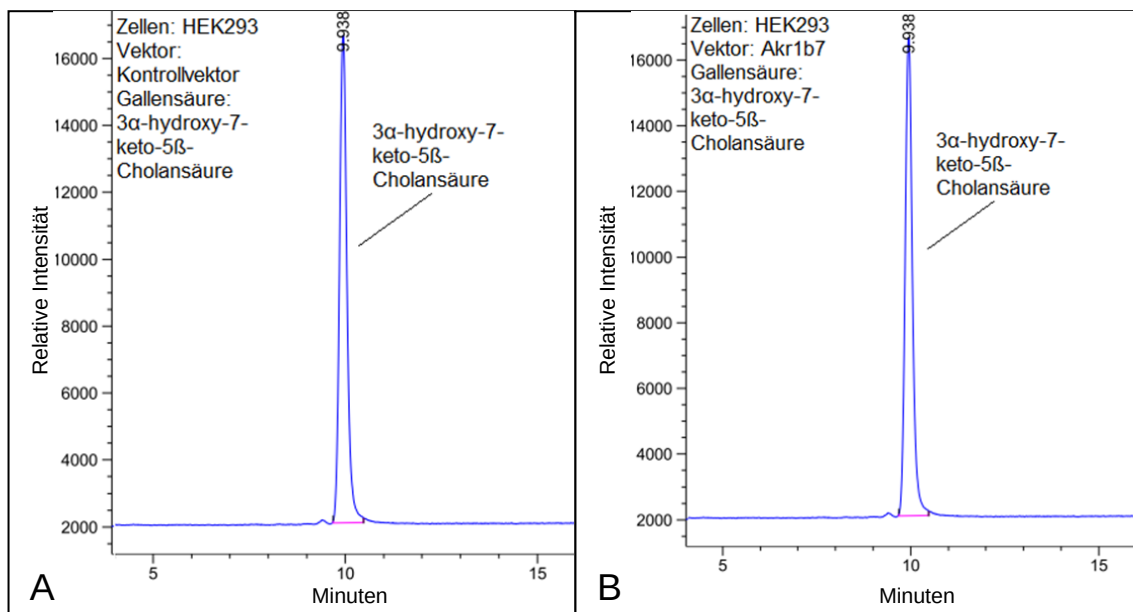


Abb. 3.14 : AKR1B7 metabolisiert 3α-Hydroxy-7-keto-5β-Cholansäure nicht.

HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3α-Hydroxy-7-keto-5β-Cholansäure behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.14 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.14 A) und mit 25 μ M 3 α -Hydroxy-7-keto-5 β -Cholansäure in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure von AKR1B7 verstoffwechselt wird. Im Kulturmediumextrakt beider Zellpopulationen wurde 3 α -Hydroxy-7-keto-5 β -Cholansäure aber keine Gallensäuremetabolite detektiert.

3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure

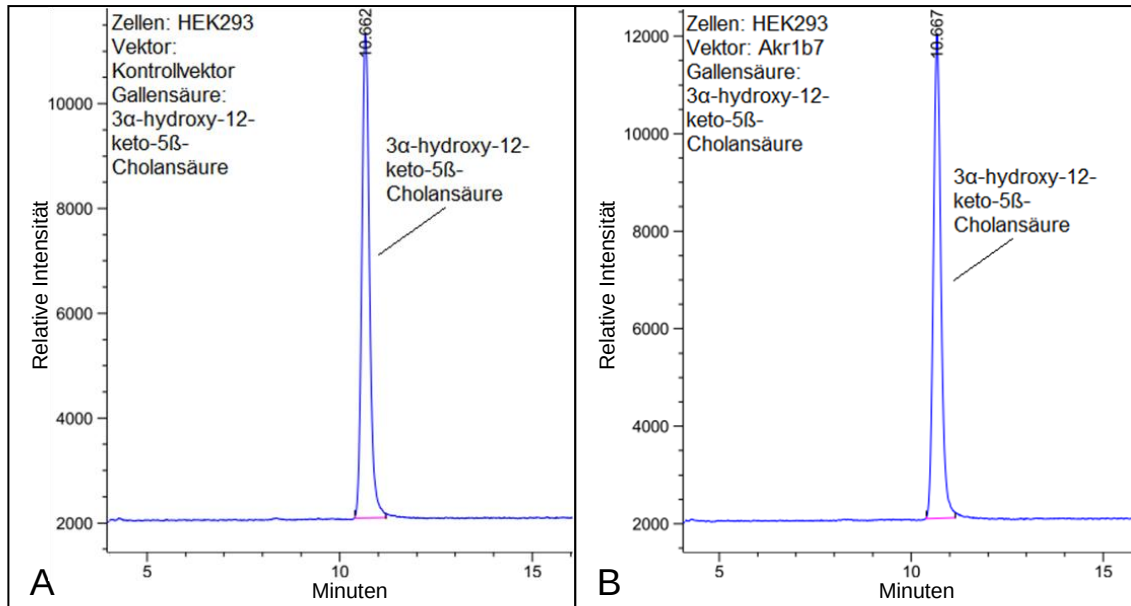


Abb. 3.15 : AKR1B7 metabolisiert 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure nicht.

HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

Die Abbildung 3.15 „AKR1B7 metabolisiert 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure nicht“ verdeutlicht den Effekt von AKR1B7 auf 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.15 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.15 A) und mit 25 μ M 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure ein Substrat von AKR1B7 ist. Im Kulturmediumextrakt beider Zellpopulationen wurde 3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure ohne Gallensäuremetabolite detektiert.

3 β -hydroxy-5 β -Cholansäure

Die Abbildung 3.16 „AKR1B7 metabolisiert 3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure nicht“ stellt den

Effekt von AKR1B7 auf 3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure dar. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.16 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.16 A) und mit 25 μ M 3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure von AKR1B7 umgesetzt wird. Es wurde 3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure ohne Gallensäuremetabolite im Kulturmediumextrakt beider Zellpopulationen detektiert.

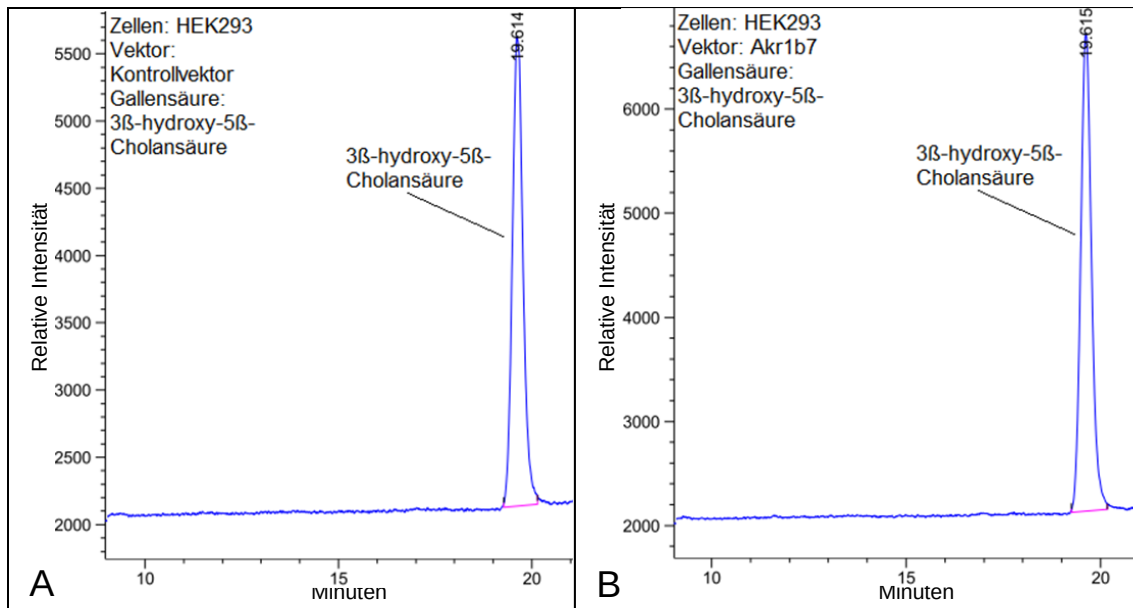


Abb. 3.16: AKR1B7 metabolisiert 3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure nicht. HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

3 β ,12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure

In der Abbildung 3.17 „AKR1B7 metabolisiert 3 β ,12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure nicht“ ist der Effekt von AKR1B7 auf 3 β ,12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure dargestellt. HEK293 Zellen wurden mit dem Akr1b7-Expressionsvektor pCMX-Akr1b7 (Abb.3.17 B) oder dem Kontrollvektor pCMX transfiziert (Abb.3.17 A) und mit 25 μ M 3 β ,12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure in Kulturmedium behandelt, um zu prüfen ob diese Gallensäure ein Substrat von AKR1B7 ist. Als Gallensäure wurde lediglich 3 β ,12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure im Kulturmediumextrakt beider Zellpopulationen detektiert.

Die Tabelle 3 in der Diskussion zeigt, welche Gallensäuren von AKR1B7 umgesetzt werden, welche Metabolite dabei entstehen, und welche Gallensäuren nicht von dem Enzym metabolisiert werden. Es zeigte sich das AKR1B7 3-Ketogruppen von Gallensäuren zu entsprechenden 3-hydroxy-Gallensäuren reduziert. Alle Hinweise deuteten darauf hin, dass AKR1B7 selektiv die Reduktionsreaktion der Gallensäuren katalysiert. Es zeigte sich keine Oxidation der 3-Hydroxygruppe der Gallensäuren, weder in α - noch in β -Stellung, und auch keine Oxidation der 7- und 12-Hydroxygruppen durch AKR1B7. Alle Hinweise deuteten darauf hin, dass die Ketogruppenreduktion durch AKR1B7 spezifisch für die 3-Ketogruppe der Gallensäuren ist. Es zeigte sich keine Reduktion der 6-Keto-, 7-Keto-, oder 12-Keto-Gruppen der Gallensäuren.

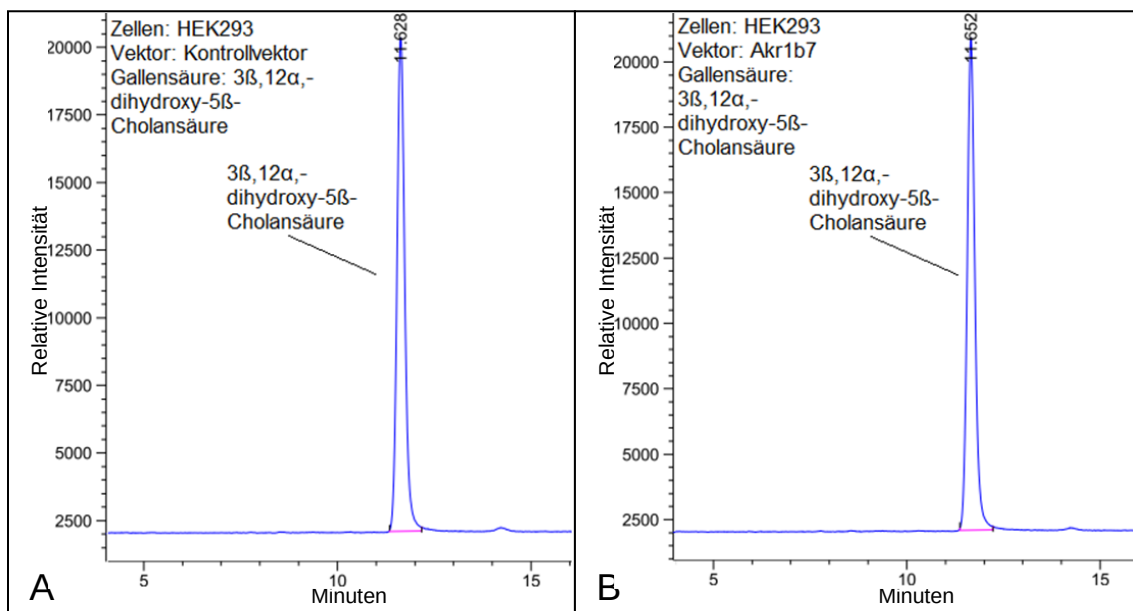


Abb. 3.17 : AKR1B7 metabolisiert 3β,12α-Dihydroxy-5β-Cholansäure nicht.

HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (A), oder Akr1b7-Expressionsvektor (B) transfiziert und mit 25 μ M 3β,12α,-Dihydroxy-5β-Cholansäure behandelt. Zellkulturmedium wurde 48 Std. nach Transfektion gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Abbildung zeigt die Massenspektren der Gallensäuren der mittels HPLC aufgetrennten Extrakte.

4. Diskussion

4.1 Bedeutung von AKR1B7

Gallensäuren werden *de novo* aus Cholesterin synthetisiert und sind Emulgatoren, die zur intestinalen Resorption von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen sowie zur Cholesterinausscheidung essentiell sind. Beim Menschen unterliegt die Gallensäurensynthese einer negativen feedback Regulation durch FXR. Außerdem wirkt FXR protektiv gegen das kolorektale Karzinom und gegen bösartige Lebertumoren. FXR wird durch toxische Gallensäuren aktiviert und induziert die AKR1B7 Expression im Darm und in der Leber. Auch im Zusammenhang damit, dass AKR1B7 Steroidhormonenebenprodukte entgiftet, kam es zur Fragestellung der vorliegenden Dissertation, ob, beziehungsweise welche Gallensäuren Substrate der AKR1B7 sind.

4.2 Stoffwechsel von Gallensäuren durch AKR1B7

Zur Beantwortung der Kernfrage wurde Akr1b7 geklont und AKR1B7 in HEK293-Zellen exprimiert. Nach Behandlung der Zellen mit Gallensäuren und 48 Stunden Inkubation wurden Lipidextrakte hergestellt, um mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS) alle Kombinationen der mono-, di- und tri-hydroxy- und Keto-Gallensäuren zu bestimmen. Die Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit haben gezeigt, dass AKR1B7 3-keto-Gallensäuren zu entsprechenden 3 β -Hydroxy-Gallensäuren reduziert.

Getestete Gallensäuren (Abkürzung des Eigennamens)	Detektierte Metabolite
3-Keto-5 β -Cholansäure (3-keto-LCA)	3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure
3,6-Diketo-5 β -Cholansäure	3 β -Hydroxy-6-keto-5 β -Cholansäure
3,7-Diketo-5 β -Cholansäure	3 β -Hydroxy-7-keto-5 β -Cholansäure
3,12-Diketo-5 β -Cholansäure	3 β -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure
3-Keto-7 α -hydroxy-5 β -Cholansäure	3 β -7 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure
3-Keto-12 α -hydroxy-5 β -Cholansäure (3-Keto-DCA)	3 β -12 α -Dihydroxy-5 β -Cholansäure

3-Keto-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -Cholansäure (3-Keto-CDCA)	3 β ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholansäure
3,7,12-Triketo-5 β -Cholansäure (dehydroCA)	3 β -Hydroxy-7,12-diketo-5 β -Cholansäure
3 α -Hydroxy-5 β -cholan acid (LCA)	keine
3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholan acid (CDCA)	keine
3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan acid (DCA)	keine
3 α ,7 α -12 α -Trihydroxy-5 β -cholan acid (CA)	keine
3 α -Hydroxy-6-keto-5 β -Cholansäure	keine
3 α -Hydroxy-7-keto-5 β -Cholansäure	keine
3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -Cholansäure	keine
3 β -Hydroxy-5 β -Cholansäure	keine
3 β ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan acid	keine

Tabelle 3: Durch AKR1B7 metabolisierte Gallensäuren.

HEK293 Zellen wurden mit einem Akr1b7-Expressionsvektor oder Kontrollvektor transfiziert und mit den angegebenen Gallensäuren (25 mM) behandelt. Zellkulturmedium wurde nach 48 Std. gesammelt und daraus Gallensäuren extrahiert. Die Extrakte wurden durch HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch mithilfe von Selected-Ion-Monitoring (SIM) im negativ-Ion-Modus analysiert. Es wurde nach allen Kombinationen der mono-, di- und tri-hydroxy- und keto-Gallensäuren ermittelt. (Adaptiert aus Schmidt et al. 2011)

4.3 Bedeutung der Prozessierung von Gallensäuren durch AKR1B7

3-keto-Gallensäuren sind toxischer als 3 α -Hydroxy-Gallensäuren

Darmbakterien sind nicht nur in der Lage CA und CDCA zu DCA beziehungsweise LCA zu dehydroxylieren, sondern oxidieren die 3 α -Hydroxygruppe dieser Gallensäuren zu 3-Keto-Gallensäuren (Hylemon und Harder 1998, Cheng und Russel 2003).

Auch das murine Enzym Cis-retinol/androgen dehydrogenase type 2 (CRAD2) oxidiert die 3 α -Hydroxygruppe der Gallensäuren zu 3-Keto-Gallensäuren, aber nicht nur im Darm sondern auch in der Leber der Maus (Su et al. 1988, Tomita et al. 2000, Cheng und Russel 2003). Im Zusammenhang damit, dass die gebildeten 3-Keto-Gallensäuren toxischer sind als ihre entsprechenden 3 α -Hydroxy-Gallensäuren, haben Cheng und Russel (2003) postuliert, dass es möglicherweise ein Enzym gibt, das der schädlichen Wirkung von CRAD2 entgegenwirkt. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen im Zusammenhang mit den unten aufgeführten Ergebnissen zur Gallensäurentoxizität, dass AKR1B7 das besagte Enzym sein könnte. Dadurch ergibt sich ein neuer Aspekt der Wirkung von CRAD2, in der Hinsicht, dass CRAD2 zwar alleine eine schädliche Wirkung auf pathogene Prozesse hat, aber zusammen mit AKR1B7 eine entgiftende Funktion zeigt,

wobei beide Enzyme jeweils einen Teilschritt der 3 β -Epimerisierung von 3 α -Hydroxy-Gallensäuren bewirkt, die zur Entgiftung letzteren in der Leber und im Darm führt.

3 β -Hydroxy-Gallensäuren sind weniger toxisch als 3 α -Hydroxy-Gallensäuren

3 β -Hydroxy-Gallensäuren konstituieren ca. 30 % der Gallensäuren des normalen menschlichen fäkalen Inhalts (Hamilton et al. 2007). Roda et al. (1983) haben gezeigt dass 3 β -hydroxy-Gallensäuren schlechtere Emulgatoren sind als 3 α -hydroxy-Gallensäuren.

Die amphiphilen Eigenschaften der Gallensäuren sind nicht nur für die Lipidabsorption im Darm verantwortlich, sie zerstören auch Zellmembrane indem sie Lipidbestandteile der Zellmembran lösen können (Perez und Briz 2009).

Ohne 3 β -hydroxy-steroid-Dehydrogenase Typ 7 (*Hsd3b7*) können Mäuse 3 β -hydroxy-Gallensäuren nicht epimerisieren. Daher besteht der Gallensäurepool *Hsd3b7*-defizienter Mäuse überwiegend aus 3 β -hydroxy-Gallensäuren. Wegen dieser Veränderung kommt es zur schweren Lipid-Malabsorption und 90% der Mäuse sterben als Neugeborene (Shea et al. 2007). Die Ergebnisse von Shea et al. (2007) veranschaulichen, dass die 3 α -hydroxy-Konformation der Gallensäuren bedeutend für die Lipid-löslichen und damit auch für die toxischen Eigenschaften der Gallensäuren *in vivo* sind (Schmidt et al. 2011).

In diesem Zusammenhang haben Schmidt et al. (2011) „cell viability“ Untersuchungen durchgeführt, die bestätigt haben, dass die Epimerisierung der 3 α -Hydroxygruppe von CDCA und DCA mit einer Entgiftung dieser Gallensäuren einherging, da 3 β -CDCA und 3 β -DCA nicht toxisch sind, im Gegensatz zum jeweiligen 3 α -hydroxy-Epimer. Dies ergab, dass die Konversion von 3 α -hydroxy-Gallensäuren zu 3 β -hydroxy-Gallensäuren ein Mechanismus zur Gallensäurenentgiftung ist, vor allem für Dihydroxy-Gallensäuren.

Im Zusammenhang dieser Ergebnisse mit den Resultaten meiner Arbeit, dass AKR1B7 die Reduktion von 3-Keto-Gallensäuren zu ihren 3 β -Hydroxyderivaten katalysiert, kam es zur Schlussfolgerung, dass AKR1B7 an der Gallensäurenentgiftung im Darm und in der Leber der Maus beteiligt ist (Schmidt et al. 2011).

Pastel et al. (2012) haben erkannt, dass es bisher keinen direkten Nachweis für eine *Akr1b7* Expression in der Leber gibt, abgesehen von „forced expression“ Experimente, so wie sie in Schmidt et al. (2011) durch Behandlung von Mäusen mit einem FXR-Agonisten durchgeführt wurde. In ähnlicher Weise ist die *Akr1b7* Expression im Ovar nur nach Gabe eines LH-Analogons beschrieben (Brockstedt et al. 2000). Möglicherweise kommt es erst zur FXR-vermittelten Hochregulierung von AKR1B7, wenn Gallensäuren in der Leber akkumulieren.

Tumorprotektion

Mäuse bei denen FXR eliminiert wurde, haben eine erhöhte Neigung zur Bildung von Kolorektal- und Lebertumoren, daher wird von einer antineoplastischen Wirkung von FXR ausgegangen (Modica et al. 2008, Maran et al. 2009, Yang et al. 2007, Schmidt et al. 2011).

Daneben gibt es eine Reihe von Literaturhinweisen aus epidemiologischen Studien (Reddy und Wynder 1977, Bayerdörffer et al. 1993, Hill 1990), aus Zellkulturexperimenten (Craven et al. 1987, Ochsenkuhn et al. 1999, Pai et al. 2004, Cheng et al. 2005, Perez et al. 2005), und aus Tierversuchen (Narisawa et al. 1974, Reddy et al. 1976, Zusman et al. 1992) die beschreiben, dass sekundäre Gallensäuren die Entstehung des Kolonkrebs fördern.

Es gibt dagegen Indizien, dass Gallensäuren mit β -Hydroxygruppen Kolonkrebs verhindern. In Ratten verhindert die therapeutische Gallensäure UDCA als β -Hydroxy-Epimer von CDCA die bekannte kanzerogene Wirkung der Cholsäure, das ausschließlich α -konfigurierte Hydroxygruppen hat (Earnest et al. 1994, Narisawa et al. 1999). Im Gegensatz zu Menschen und Ratten, besitzt ein hoher Anteil muriner Gallensäuren β -Hydroxygruppen. Dies wäre eine Erklärung für die niedrige Inzidenz des spontan auftretenden Kolonkrebs in Mäusen (Schmidt et al. 2011).

In diesem Zusammenhang ist es plausibel, dass die Wirkung von AKR1B7 zur antineoplastischen Wirkung von FXR beiträgt, indem FXR *Akr1b7* induziert und AKR1B7 an der 3β -Hydroxy Epimerisierung sekundärer Gallensäuren beteiligt ist.

Es wird beschrieben, dass einige 3β -Hydroxygallensäuren weniger wirksame FXR-Liganden sind als 3α -Hydroxygallensäuren. Im oben angegebenen Versuch von Shea et al. (2007), bei dem *Hsd3b7*-Knockout-Mäuse keine 3β -Hydroxy-Gallensäuren epimerisieren können, war die FXR-vermittelte negative Feedbackregulation der Gallensäurensynthese unterbrochen (Shea et al. 2007). CA und DCA sind Gallensäuren mit 3α -Hydroxykonformation und sind hoch wirksame FXR-Liganden (Li et al. 2002). Dagegen kam es bei 3β -Hydroxy-DCA und 3β -Hydroxy-CA zur verminderten Induktion von Reportergen im FXR-Reportergen-Assay gegenüber den entsprechenden 3α -Epimeren, DCA beziehungsweise CA (Schmidt et al. 2011). Dies passt ins Bild eines FXR/AKR1B7-abhängigen Signalwegs zur Entgiftung von toxischen Gallensäuren.

Mögliche humane AKR1B7-Analoga

Es stellt sich die Frage, ob es ein humanes AKR1B7 Analogon gibt. Im Folgenden werden zwei in dieser Hinsicht viel versprechende AKRs diskutiert.

AKR1B10

Eine Möglichkeit ist, dass das humane AKR1B10 die im Rahmen dieser Promotionsarbeit entdeckten Funktionen der murinen AKR1B7 hat. Von allen humanen Mitgliedern der AKR-Familie ist AKR1B10 der murinen AKR1B7 am meisten ähnlich. Sie zeigen eine 89% Aminosäurenidentität, und werden beide hauptsächlich in der Leber aber auch im Intestinum und Nebenniere exprimiert.

Seit der Entdeckung des AKR1B10 im Jahr 1998 wurde dieses Enzym mehrmals mit einer tumorprotektiven Wirkung in Verbindung gebracht. Wang et al. (2010) haben festgestellt, dass das Rauchen zur Hochregulierung von AKR1B10 im Epithel der Atemwege führt. Möglicherweise geschieht dies, um in die Lunge aufgenommene Karzinogene zu entgiften. Dem Enzym wird eine antikarzinogene Wirkung im Darm und in der Leber bereits zugesichert. Es wurde beschrieben, dass AKR1B10 die Krebsentwicklung und –progression in der humanen Leber reguliert, indem es reaktive Carbonylgruppen entgiftet. (Liu et al., 2009a; Diez-Dacal et al., 2011).

Diese Hinweise lassen daran denken, dass AKR1B10 möglicherweise das humane AKR1B7-Analogon in der Leber und im Darm ist und eine krebsverhindernde Funktion wahrnimmt, indem es verhindert, dass es zu toxischen Mengen an 3 α -hydroxy-Gallensäuren kommt.

Im Kolonepithel von Kolonkrebspatienten ist die AKR1B10 Expression vermindert. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, das murines AKR1B8, dass bereits als humanes Analogon im Darm angesehen wird und eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit mit AKR1B7 hat, protektiv gegen Kolitis-assoziiertem Kolonkrebs wirkt (Shen et al 2015). Bisher ist weder geklärt, durch welchen Mechanismus AKR1B10 gegen Kolonkrebs wirkt, noch ob AKR1B10 Gallensäuren umsetzt.

Zur Klärung der Frage, ob AKR1B10 in einem humanen Signalweg wirkt, der einem Gallensäuren-entgiftenden FXR/AKR1B7 Signalweg entspricht, ist von Interesse, ob AKR1B10 von FXR reguliert wird. AKR1B10 wurde nicht als Zellantwort auf den synthetischen FXR-Agonisten GW4064 in humanen Hepatoma Zellen (HepG2-Zellen)

induziert, obwohl die Zellen FXR- und AKR1B10-mRNA exprimierten (Schmidt et al. 2011). Dies spricht dagegen, dass AKR1B10 durch FXR reguliert wird. Das Fehlen des FXRE (engl. FXR response element) im AKR1B10 Promoter zeigt, dass FXR zumindest nicht direkt als AKR1B10 Transkriptionsfaktor wirkt. (Schmidt et al. 2011).

Es wäre aber denkbar, dass AKR1B10 von FXR *in vivo* über ein Signalweg induziert wird, der sich nicht in HepG2-Zellen zeigt, und das es Transkriptionsfaktoren aktiviert oder induziert, die an den AKR1B10 Promotor binden.

Zum Vergleich der Regulierung der Genexpression von AKR1B7 und AKR1B10 stellt sich die Frage, ob AKR1B10 von den anderen AKR1B7-regulierenden nukleären Rezeptoren PXR, LXR, und CAR hochreguliert wird. Liu et al. (2009) haben gezeigt das die Regulierung der AKR1B10 Genexpression nicht von PXR vermittelt wird. Es ist bisher nicht klar, wie das AKR1B10 Gen reguliert wird (Nishinaka et al. 2015). Möglicherweise trägt AKR1B10 zur Gallensäuren-Entgiftung bei, auch ohne das es durch FXR oder PXR reguliert wird.

AKR1B1

Neben AKR1B10 kommt auch AKR1B1 als humanes AKR1B7-Analogon in Frage. Die AKR1B1 und AKR1B10 Gensequenzen sind zu 71% identisch.

AKR1B1 wurde bereits deshalb mit AKR1B7 verglichen, weil AKR1B1 und AKR1B14 auf ähnlicher Weise mit NADPH komplexieren und AKR1B14 das AKR1B7 ortholog in Ratten ist (Sundaram et al. 2012). Wie AKR1B7 (Martinez et al. 2001), reduziert auch AKR1B1 4-Hydroxynonenal (Srivastava et al 1995), und wird ubiquitär, also auch im Darm und in der Leber exprimiert.

AKR1B1 ist die AKR zu der bisher am meisten geforscht wurde. Die Forschung beschäftigte sich hauptsächlich mit der Rolle des Enzyms im Glukosemetabolismus, weil es das Schlüsselenzym des Polyolpfads des Glukosekatabolismus ist. Es wurden AKR1B1 Inhibitoren entwickelt, um diabetischen Komplikationen entgegen zu wirken.

Einige Autoren kommen in neueren Studien zu dem Schluss, dass dieses Enzym möglicherweise eine bedeutende antioxidative Rolle spielen könnte, weil AKR1B1 Lipidperoxide entgiftet, die ansonsten zur Zellschädigung und –proliferation führen (Ramana 2011, Srivastava et al. 2012).

In der Literatur wird beschrieben, dass AKR1B1 bei inflammatorischen Erkrankungen wie Sepsis und Krebs hoch exprimiert wird (Ramana 2011, Chen et al. 2012). Wie AKR1B10

entgiftet auch AKR1B1 reaktive Carbonylgruppen und verhindert auf diese Weise die Progression hepatischer Tumoren (Liu et al 2009a, Diez-Dacal et al. 2011).

Srivastava et al. (2012) haben gezeigt, dass die Gabe des AKR1B1 Inhibitors Fidarestat, zur signifikanten Verminderung des Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) Signals führt. Da TNF α die Apoptose von Tumorzellen vermittelt, ist die Hemmung des TNF α Signals durch ein AKR1B1 Inhibitor ein weiteres Indiz dafür, dass AKR1B1 eine antineoplastische Funktion hat. Fidarestat wurde bereits in einer Phase III Studie für nicht sehr wirksam gegen diabetische Neuropathie erklärt (Srivastava et al. 2012). Möglicherweise könnte der Inhibitor genutzt werden, um zu prüfen, ob sich eine Inhibition des AKR1B1 auf die Zusammensetzung des Gallensäuren-pools auswirkt. Bevor eine Studie dieser Art durchgeführt wird, wäre es interessant zu erfahren, welches Ergebnis vorliegen würde, wenn in den Versuchen die zur vorliegenden Arbeit geführt haben, AKR1B7 mit AKR1B1 substituiert wird. Jedenfalls gibt es viele Indizien dafür, dass AKR1B1 ein humanes Analogon zu AKR1B7 ist.

Die Frage bleibt offen, ob humane Mitglieder der AKR-Familie 3-keto-Gallensäuren zu 3 β -hydroxy-Gallensäuren metabolisieren und ob diese die von FXR induziert werden oder bei Akkumulation toxischer Gallensäuren hochreguliert werden.

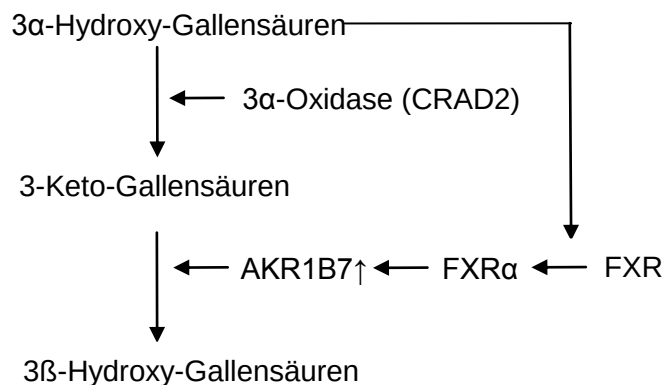


Abbildung 4: Gallensäurenentgiftung durch AKR1B7. Im Darm und in der Leber wird FXR durch toxische 3 α -Hydroxy-Gallensäuren aktiviert (FXR α) und bewirkt dort eine AKR1B7-Induktion. Die 3 α -Oxidase CRAD2 oxidiert 3 α -Hydroxy-Gallensäuren zu stärker toxischen 3-Keto-Gallensäuren und AKR1B7 reduziert sie zu nicht toxischen 3 β -Hydroxy-Gallensäuren.

Durch die Ergebnisse meiner Arbeit wurden erstmals endogene intestinale Substrate von AKR1B7 identifiziert, und somit eine Erklärung geliefert, wie FXR als Gallensäurensensor im „feedforward“ Regelkreis gegen Kolorektal- und Lebertumoren schützen könnte

(Abb.4). Diese Ergebnisse wurden in Schmidt et al. (2011) publiziert, seitdem wurde die Rolle von AKR1B7 im xenobiotischen Metabolismus und bei der Lipidperoxidation zitiert (Chen und Zhang 2012).

4.4 Ausblick

Weitere Studien könnten die Frage beantworten ob es einen humanen Signalweg gibt der dem murinen FXR-AKR1B7-Signalweg entspricht, und ob AKR1B1 oder AKR1B10 humane Analoga der murinen AKR1B7 sind, indem sie eine Funktion zur Entgiftung von Gallensäuren im humanen Darm und in der humanen Leber haben.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob Gallensäuren Substrate von AKR1B7 sind. Um dies zu untersuchen wurde die Akr1b7 cDNA aus muriner Nebenniere kloniert und als Transgen in HEK293-Zellen exprimiert. CRAD2, das einige Gallensäuren oxidiert, wurde ebenfalls in HEK293 Zellen exprimiert, um dem untersuchten Enzym AKR1B7 spezifische Keto-Gallensäuren als Substrate zu liefern. Um Akr1b7-exprimierende Vektoren herzustellen, wurde RNA aus murinem Nebennierengewebe isoliert, in cDNA revers transkribiert, und Akr1b7 anschließend mittels PCR amplifiziert. Crad2 wurde direkt aus einer Ligation amplifiziert und die Akr1b7 und Crad2 Amplifikation wurde gelelektrophoretisch dargestellt. Akr1b7 und Crad2 wurden in einen Expressionsvektor kloniert und die Expression nach erfolgter Transfektion mittels Western Blot Technologie überprüft. Lipidextrakte der transfizierten Zellen wurde mittels HPLC/MS analysiert, um die Bildung von mono-, di- und tri-hydroxy- und keto-Gallensäuren zu untersuchen. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, das AKR1B7 selektiv die Reduktionsreaktion der 3-Ketogruppen der Gallensäuren zu 3 β -Hydroxygruppen entsprechender Gallensäuren reduziert. Dabei setzt AKR1B7 eine Zwischenstufe der 3 β -Epimerisierung primärer Gallensäuren um, so dass AKR1B7 und die 3 α -Oxidase CRAD2 zusammen in der Lage sind, Gallensäuren mit toxischen Eigenschaften umzusetzen und dabei zu entgiften. Durch die Ergebnisse meiner Arbeit wurden erstmals endogene intestinale Substrate von AKR1B7 identifiziert, und eine Erklärung geliefert, wie FXR gegen Kolorektal- und Lebertumoren schützen könnte.

Abstract:

The aim of this dissertation was to investigate whether bile acids are substrates of AKR1B7. For this purpose, Akr1b7 cDNA was cloned from murine adrenal gland tissue and expressed in HEK293 cells. CRAD2 3 α -oxidizes a variety of bile acids, and was coexpressed with AKR1B7 so that the effect AKR1B7 has on specific bile acids could be determined. To produce Akr1b7 expression vectors, RNA was extracted from murine adrenal glands, and reverse transcribed to cDNA from which Akr1b7 was amplified using PCR. All amplification was shown using electrophoresis. Akr1b7 and Crad2 were cloned into expression vectors which were transfected and subsequent expression was monitored by Western blot. Lipid extracts of the transfected cells were analysed by HPLC/MS, to detect mono-, di-, and tri-hydroxy bile acids. The results led to the conclusion that AKR1B7

selectively reduces the 3-keto groups of bile acids to their 3 β -hydroxy equivalents. By doing so, AKR1B7 is able to detoxify bile acids together with CRAD2. The results of my work identified the first known endogenous intestinal substrates for AKR1B7 and provided a mechanism for how FXR may protect against colorectal cancer and liver tumors.

6. Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
ACOX2	„branched-chain acyl-coenzym A oxidase“
AKR	Aldoketoreduktase
AKR1B7	Aldoketoreduktase 1B7
AMACR	2-Methylacyl-Coenzym A Racemase
Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
BAT	Brown adipose tissue
BAT	GallensäurenCoenzymA:AminosäureN-Acetyltransferase
BACS	Gallensäuren Coenzym A Ligase
BFS	Bovine Fetal Serum
CA	Cholsäure
CDCA	Chenodesoxycholsäure
cDNA	Complementary DNA
CG	Cytosin and Guanidin
CMV	Cytomegalie Virus
Crad2	Cis-retinol/androgen dehydrogenase type 2
CYP	Cytochrom P450 Enzym
DBP	„D-bifunctional protein“
DCA	Desoxycholsäure
dehydroCA	3,7,12-triketo-5 β -Cholansäure
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
FXRE	FXR response element
g	Gramm
HSD3B7	3 β -Hydroxy-delta5-C27-Steroid Oxidoreduktase
HEK293	Human Embryonic Kidney 293
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Lurie Broth Medium
LCA	Lithocholsäure
M	Mol
mA	Milliampere
mRNA	messenger RNA
min	Minute
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGF	Platelet derived growth Factor
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonucleic acid
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SCP2	Peroximale Thiolase 2
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Std	Stunde
SULT2A1	Sulfotransferase2a1
TGR5	G-protein gekoppelter Gallensäurenrezeptor
TNF α	Tumor necrosis factor

7. Literaturverzeichnis

Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssière, G., Jean, C. I. (1999). Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* 160, 147–154.

Baumann, C., Davies, M., Peters, U., Kaufmann-Reiche, M., Lessl, and F. Theuring. 2007. AKR1B7 (mouse vas deferens protein) is dispensable for mouse development and reproductive success. *Reproduction* 134:97 – 109.

Berr F, Pratschke E, Fischer S, Paumgartner G (1992). Disorders of bile acid metabolism in cholesterol gallstone disease. *J Clin Invest.* Sep;90(3):859-68.

Bayerdörffer E, Mannes GA, Richter WO, Ochsenkühn T, Wiebecke B, Köpcke W, Paumgartner G. (1993) Increased serum deoxycholic acid levels in men with colorectal adenomas. *Gastroenterology.* Jan;104(1):145-51.

Binder H (2005) Malabsorptionssyndrome. In: *Harrisons Innere Medizin.* Dietel M (Hrg.) 16. Aufl., Bd. 2, Lehmanns Media übernommen von McGraw-Hill, London und ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, Leiben, 1898-1910.

Bohren K, Bullock B, Wermuth B & Gabbay K (1989) The aldo–keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *Journal of Biological Chemistry* 264 9547–9551.

Boulias K., Katrakili N., Bamberg K., Underhill P., Greenfield A., Talianidis I. 2005. Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *EMBO J.* 24: 2624–2633.

Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C & Lessl M (2000) Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* 141 2574–2581.

Brul S, Westerveld A, Strijland A, Wanders RJ, Schram AW, Heymans HS, Schutgens RB, van den Bosch H, Tager JM. (1988) Genetic heterogeneity in the cerebrohepatorenal (Zellweger) syndrome and other inherited disorders with a generalized impairment of peroxisomal functions. A study using complementation analysis. *J Clin Invest.* Jun;81(6):1710-5.

Carothers AM, Urlaub G, Mucha J, Grunberger D, Chasin LA (1989) Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. *Biotechniques.* May;7(5):494-6, 498-9.

Carswell E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, B. Williamson (1975), An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 pp. 3666–3670

- Cali JJ, Hsieh CL, Francke U, Russell DW(1991). Mutations in the bile acidbiosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem.* 1991 Apr 25;266(12):7779-83.
- Chen WD, Zhang Y. 2012 Regulation of aldo-keto reductases in human diseases. *Front Pharmacol.* Mar 9;3:35. doi: 10.3389/fphar.2012.00035. eCollection 2012
- Cheng J, Russel D (2003) Adolf Windaus prize lecture. In: *Bile acids: From genomics to disease and therapy.* G. Paumgartner (Hrg.) Springer, Hamburg, New York, 1-14
- Cheng K, Raufman J.(2005) Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Bioch Pharm.*;70:1035–1047.
- Chiang J. Y., Kimmel R., Stroup D. 2001. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene.* 262: 257–265.
- Chiang J (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 50(10): 1955–1966.
- Choksi V, Hoeffner E, Karaarslan E, Yalcinkaya C, Cakirer S. Infantile refsum disease: case report. (2003)*AJNR Am J Neuroradiol.* Nov-Dec;24(10):2082-4.
- Chomczynski P, Mackey K(1995) Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 19(6):942-5.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9.
- Craven PA, Pfanstiel J, DeRubertis FR. Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation and reactive oxygen formation by bile acids. *J Clin Invest.* 1987;79:532–541.
- Del Castillo-Olivares A., Campos J. A., Pandak W. M., Gil G. 2004. Role of FTF/LRH-1 on bile acid biosynthesis. A known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279: 16813–16821.
- Diez-Dacal, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Timms, J. F., Coderch, C., Gago, F., and Perez-Sala, D. (2011).Identification of aldo-keto reductase AKR1B10 as a selective target for modification and inhibition by prostaglandin A(1): implications for antitumoral activity. *Cancer Res.* 71, 4161–4171. (Zitiert in Chen et al. (2012), nicht auf Pubmed auffindbar)
- Earnest DL, Holubec H, Wali RK, Jolley CS, Bissonette M, Bhattacharyya AK, Roy H, Khare S, Brasitus TA. (1994) Chemoprevention of azoxymethane-induced colonic carcinogenesis by supplemental dietary ursodeoxycholic acid. *Cancer Res.* 54(19):5071-4.

- Ferdinandusse S, Denis S, Clayton PT, Graham A, Rees JE, Allen JT, McLean BN, Brown AY, Vreken P, Waterham HR, Wanders RJ (2000). Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet.* Feb;24(2):188-91.
- Ferdinandusse, S., Ylianttila, M. S., Gloerich, J., Koski, M. K., Oostheim, W., Waterham, H. R., Glumoff, T. (2006). Mutational Spectrum of d-Bifunctional Protein Deficiency and Structure-Based Genotype-Phenotype Analysis. *American Journal of Human Genetics*, 78(1), 112–124.
- Ge, X., L. Yin, H. Ma, T. Li, J. Y. L. Chiang, and Y. Zhang. Aldo-keto reductase 1B7 is a target gene of FXR and regulates lipid and glucose homeostasis. *J. Lipid Res.* 2011.
- Gelfand DH, J.J.Sninsky and T.J.White (1990) PCR Protocols (Hrg.) Academic Press, New York, 3-12.
- Groppe JC, Morse DE (1993) Isolation of full-length RNA templates for reverse transcription from tissues rich in RNase and proteoglycans. *Anal Biochem.* 1993 1;210(2):337-43.
- Goodwin B., Jones S. A., Price R. R., Watson M. A., McKee D. D., Moore L. B., Galardi C., Wilson J. G., Lewis M. C., Roth M. E., et al. 2000. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell.* 6: 517–526.
- Goodwin B, Watson MA, Kim H, Miao J, Kemper JK, Kliewer SA. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol.* 2003 Mar;17(3):386-94..
- Hamilton JP, Xie G, Raufman JP, Hogan S, Griffin TL, Packard CA, Chatfield DA, Hagey LR, Steinbach JH, Hofmann AF(2007) Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293(1):G256-63.
- Han S., Chiang J. Y. 2009. Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 37: 469–478.
- Heeren J, Münzberg H.(2013) Novel aspects of brown adipose tissue biology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 42(1):89-107.
- Hill MJ. Bile flow and colon cancer. *Mutat Res.* 1990;238:13–32.
- Hofmann AF. (1999) The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease.*Arch Intern Med.* 159(22):2647-58.

- Hofmann AF, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2009) Chronic diarrhea due to excessive bile acid synthesis and not defective ileal transport: A new syndrome of defective FGF19 release. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 7(11): 1151–1154.
- Holt J. A., Luo G., Billin A. N., Bisi J., McNeill Y. Y., Kozarsky K. F., Donahee M., Wang D. Y., Mansfield T. A., Kliewer S. A., et al. (2003) Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 17: 1581–1591.
- Houten S M, Watanabe M, Auwerx J (2006) Endocrine functions of bile acids. *EMBO J.* 25: 1419–1425.
- Hylemon PB, Harder J (1998) Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 22(5):475-88.
- Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV, Penning TM. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact.* 2003 Feb 1;143-144:621-31.
- Innis MA, Gelfand DH (1990). Optimization of PCRs. in: *PCR Protocols.* M.A.Innis, D.H.Gelfand, J.J.Sninsky and T.J.White (Hrg.) Academic Press, New York, 3-12.
- Ishibashi S, Schwarz M, Frykman PK, Herz J, Russell DW. Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice (1996). Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J Biol Chem.* Jul 26;271(30):18017-23.
- Ito S., Fujimori T., Furuya A., Satoh J., Nabeshima Y. 2005. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking betaKlotho. *J. Clin. Invest.* 115: 2202–2208.
- Jez J, Flynn T & Penning T 1997 A new nomenclature for the aldo–keto reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology* 54 639–647.
- Kang DJ, Ridlon JM, Moore DR 2nd, Barnes S, Hylemon PB. *Clostridium scindens* baiCD and baiH genes encode stereo-specific 7 α /7 β -hydroxy-3-oxo- Δ^4 -cholenoic acid oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan-Feb;1781(1-2):16-25.
- Kerr T. A., Saeki S., Schneider M., Schaefer K., Berdy S., Redder T., Shan B., Russell D. W., Schwarz M. 2002. Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. *Dev. Cell.* 2: 713–720.
- Kim I., Ahn S. H., Inagaki T., Choi M., Ito S., Guo G. L., Kliewer S. A., Gonzalez F. J. 2007. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J. Lipid Res.* 48: 2664–2672.
- Kuipers F, Claudel T, Sturm E, Staels B (2004) The Farnesoid X Receptor (FXR) as modulator of bile acid

metabolism. *Rev Endocr Metab Disord.* 5(4):319-26.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*; 227:680-5

Lau ET, Cao D, Lin CS, Chung S & Chung S (1995) Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochemical Journal* 312 609–615.

Lee, Y. K., Schmidt, D. R., Cummins, C. L., Choi, M., Peng, L., Zhang, Y., Goodwin, B., Hammer, R. E., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2008) *Mol. Endocrinol.* 22, 1345–1356

Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 89: 147–191.

Lefrançois-Martinez, A. M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssière, G., and Jean, C. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 32875–32880

Li T., Chiang J. Y. 2004. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor (PXR) inhibition of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: G74–G84.

Li T., Jahan A., Chiang J. Y. 2006. Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells. *Hepatology.* 43: 1202–1210.

Li T., Chiang J. Y. 2007. A novel role of transforming growth factor β 1 in transcriptional repression of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Gastroenterology.* 133: 1660–1669.

Li-Hawkins, J., Gåfvels, M., Olin, M., Lund, E. G., Andersson, U., Schuster, G., Björkhem, I., Russell, D. W., and Eggertsen, G. (2002) *J. Clin. Invest.* 110, 1191–1200

Liu MJ, Takahashi Y, Wada T, He J, Gao J, Tian Y, Li S, Xie W. (2009) The aldo-keto reductase Akr1b7 gene is a common transcriptional target of xenobiotic receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol.* 76(3):604-11

Liu, J., Wen, G., and Cao, D. (2009a). Aldo-keto reductase family 1 member B1 inhibitors: old drugs with new perspectives. *Recent Pat. Anticancer Drug. Discov.* 4, 246–253. (Zitiert in Chen et al. (2012), nicht auf Pubmed auffindbar)

Lu T. T., Makishima M., Repa J. J., Schoonjans K., Kerr T. A., Auwerx J., Mangelsdorf D. J. 2000. Molecular

basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell.* 6: 507–515.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* Nov;193(1):265-275

Maran RR, Thomas A, Roth M, Sheng Z, Esterly N, Pinson D, Gao X, Zhang Y, Ganapathy V, Gonzalez FJ, Guo GL. (2009) Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther.* 328(2):469-77

Martinez, A., Aigueperse, C., Val, P., Dussault, M., Tournaire, C., Berger, M., Veyssière, G., Jean, C., and Lefrançois Martinez, A. (2001) *Chem. Biol. Interact* 130–132, 903–917

Martinez, A., Val, P., Sahut-Barnola, I., Aigueperse, C., Veyssière, G., and Lefrançois-Martinez, A.-M. (2003). Steroidogenic factor-1 controls the aldose reductase *akr1b7* gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. *Endocrinology* 144, 2111–2120.

Mataki C., Magnier B. C., Houten S. M., Annicotte J. S., Argmann C., Thomas C., Overmars H., Kulik W., Metzger D., Auwerx J., et al. 2007. Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1. *Mol. Cell. Biol.* 27: 8330–8339.

Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, Moschetta A. (2008) Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 9589–9594

Narisawa T, Magadia NE, Weisburger JH, Wynder EL. (1974) Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J Natl Cancer Inst.*;53(4):1093–1097.

Narisawa T, Fukaura Y, Terada K, Sekiguchi H. (1999) Inhibitory effects of ursodeoxycholic acid on N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis and colonic mucosal telomerase activity in F344 rats. *J Exp Clin Cancer Res.* 18(2):259-66.

Nishinaka T, Miura T, Sakou M, Hidaka C, Sasaoka C, Okamura A, Okamoto A, Terada T. Down-regulation of aldo-keto reductase *AKR1B10* gene expression by a phorbol ester via the ERK/c-Jun signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 2015 Jun 5;234:274-81.

Ochsenkuhn T, Bayerdörffer E, Meining A, Schinkel M, Thiede C, Nussler V, Sackmann M, Hatz R, Neubauer A, Paumgartner G. Colonic mucosal proliferation is related to serum deoxycholic acid levels. *Cancer.* 1999;85(8):1664–1669.

Pai R, Tarnawski AS, Tran T. 2004. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol Biol Cell.*;15(5):2156–2163.

Pailhoux, E. A., Martinez, A., Veyssiere, G. M., and Jean, C. G. (1990). Androgen-dependent protein from mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* 265, 19932–19936.

Pailhoux, E., Veyssiere, G., Fabre, S., Tournaire, C. and Jean, C. (1992) The genomic organization and DNA sequence of the mouse vas deferens androgen-regulated protein gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 (6), 561-568

Pandak W. M., Heuman D. M., Hylemon P. B., Chiang J. Y., Vlahcevic Z. R. 1995. Failure of intravenous infusion of taurocholate to down-regulate cholesterol 7 α -hydroxylase in rats with biliary fistulas. *Gastroenterology*. 108: 533–544.

Pastel E, Pointud JC, Volat F, Martinez A, Lefrançois-Martinez AM. 2012 Aldo-Keto Reductases 1B in Endocrinology and Metabolism. *Front Pharmacol.* Aug 2;3:148.

Paumgartner G, Sauerbruch T (1991). Gallstones: pathogenesis. *Lancet*. Nov 2;338(8775):1117-21. Review. PubMed PMID: 1682550.

Pérez-Ramos P, Olmo N, Turnay J, Lecona E, González de Buitrago G, Portolés MT, Lizarbe MA. (2005) Effect of bile acids on butyrate-sensitive and –resistant human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer*.;53(2):208–219.

Perez MJ, Briz O. (2009) Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* (14):1677-89.

Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, Kane JP. (2002) Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(1):109-17.

Ramana KV. (2011) ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme. *Biomol Concepts*.2(1-2):103-114.

Reddy BS, Narasawa T, Weisburger JH, Wynder EL (1976). Promoting effect of sodium deoxycholate on colon adenocarcinomas in germfree rats. *J Natl Cancer Inst.*;56(2):441–442.

Reddy BS, Wynder EL (1977). Metabolic epidemiology of colon cancer. Fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps. *Cancer*.;39:2533–2539.

Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* 47(2):241-59.

Roda A, Hofmann AF, Mysels KJ (1983) The influence of bile salt structure on self-association in aqueous

solutions. J Biol Chem. 258(10):6362-70.

Russell DW, Eggertsen G. (2002) Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. J Clin Invest. 110(8):1191-200.

Russell DW (2003) The enzymes, regulation and genetics of bile acid synthesis. Annu Rev Biochem. Vol. 72: 137-174

Russell DW, Setchell KD, 1992. Bile acid biosynthesis. Biochemistry. May 26;31(20):4737-49.

Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. Annu Rev Biochem. 1994;63:25-61. Review. PubMed PMID: 7979239.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2te Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 5-72.

Schick BP, Eras J (1995) Proteoglycans partially co-purify with RNA in TRI Reagent and can be transferred to filters by northern blotting. Biotechniques 18(4):574-6, 578.

Schmidt DR, Schmidt S, Holmstrom SR, Makishima M, Yu RT, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. (2011) AKR1B7 is induced by the farnesoid X receptor and metabolizes bile acids. J Biol Chem. 286(4):2425-32.

Schwarz M, Wright AC, Davis DL, Nazer H, Björkhem I, Russell DW (2000). The bile acid synthetic gene 3beta-hydroxy-Delta(5)-C(27)-steroid oxidoreductase is mutated in progressive intrahepatic cholestasis. J Clin Invest. 2000 Nov;106(9):1175-84.

Scotti E, Gilardi F, Godio C, Gers E, Krneta J, Mitro N, De Fabiani E, Caruso D, Crestani M (2007) Bile acids and their signaling pathways: eclectic regulators of diverse cellular functions. Cell Mol Life Sci. 64(19-20):2477-91.

Setchell KD, Suchy FJ, Welsh MB, Zimmer-Nechemias L, Heubi J, Balistreri WF. (1988) Delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase deficiency described in identical twins with neonatal hepatitis. A new inborn error in bile acid synthesis. J Clin Invest. Dec;82(6):2148-57.

Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, Thompson HR, Weslie Tyson R, Sokol RJ, Russell DW(1998). Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. J Clin Invest. Nov 1;102(9):1690-703.

Shea HC, Head DD, Setchell KD, Russell DW (2007) Analysis of HSD3B7 knockout mice reveals that a

3alpha-hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function.

Proc Natl Acad Sci U S A. 104(28):11526-33.

Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA. (2001) The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(6):3369-74.

Shen Y, Liao DF, Cao D.(2015) AKR1B10 in gastrointestinal diseases. Aging (Albany NY). Apr;7(4):221-2

Srivastava S, Chandra A, Bhatnagar A, Srivastava SK, Ansari NH (1995) Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. Biochem Biophys Res Commun. Dec 26; 217(3):741-6.

Su J, Chai X, Kahn B, Napoli JL. cDNA cloning, tissue distribution, and substrate characteristics of a cis-Retinol/3alpha-hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme. J Biol Chem. 1998 Jul 10;273(28):17910-6.

Suggs SV, Hirose T, Miyake T, Kawashima EH, Johnson MJ, Itakura K, Wallace RB (1981) Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In: Developmental biology using purified genes. D.D. Brown (Hrg.) Academic Press, New York, 683-693.

Sundaram K1, Endo S, Matsunaga T, Tanaka N, Hara A, El-Kabbani O.(2012) Structure of the His269Arg mutant of the rat aldose reductase-like protein AKR1B14 complexed with NADPH.Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 68(Pt 4):400-3.

Taragnat C, Berger M, Jean C. Identification and androgen-dependence of proteins in the mouse vas deferens. Int J Androl. 1986 Aug;9(4):299-311.

Taragnat C, Berger M & Jean C 1988 Preliminary characterization, androgen-dependence and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferens. Journal of Reproduction and Fertility 83 835–842.

Thein SL, Wallace RB (1986) The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Human genetic diseases: a practical approach. K.E.Davies (Hrg.) IRL Press, Oxford, United Kingdom, 33-50.

Thomas C, Auwerx J, Schoonjans K. (2008) Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5--connecting nutrition and metabolism. Thyroid. 18(2):167-74.

Thomas C., Pellicciari R., Pruzanski M., Auwerx J., Schoonjans K. 2008. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 7: 678–693.

Tomita K, Sato M, Kajiwara K, Tanaka M, Tamiya G, Makino S, Tomizawa M, Mizutani A, Kuwano Y, Shiina T, Ishii H, Kimura M. Gene structure and promoter for Crad2 encoding mouse cis-retinol/3alpha-hydroxysterol

short-chain dehydrogenase isozyme. *Gene*. 2000 Jun 27;251(2):175-86.

Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*. 65(7):1255-66.

Vernon E Coyne, M Diane James, Sharon J Reid and Edward P Rybicki (2001) PCR Primer Design and Reaction Optimization. In: *Molecular Biology Techniques Manual*. 3rd Edition. Cape Town, South Africa [Online im Internet.] URL: <http://www.mcb.uct.ac.za/Manual/pcroptim.htm> [Stand: 08.07.12]

Vlahcevic ZR1, Eggertsen G, Björkhem I, Hylemon PB, Redford K, Pandak WM.(2000) Regulation of sterol 12 α -hydroxylase and cholic acid biosynthesis in the rat. *Gastroenterology*. 2000 Mar;118(3):599-607.

Wang H., Chen J., Hollister K., Sowers L. C., Forman B. M. 1999. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell*. 3: 543–553.

Wang L., Lee Y. K., Bundman D., Han Y., Thevananther S., Kim C. S., Chua S. S., Wei P., Heyman R. A., Karin M., et al. 2002. Redundant pathways for negative feedback regulation of bile Acid production. *Dev. Cell*. 2: 721–731.

Wang, R., Wang, G., Ricard, M. J., Ferris, B., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Hackett, N. R., Gudas, L. J., and Crystal, R. G. (2010). Smoking-induced upregulation of AKR1B10 expression in the airway epithelium of healthy individuals. *Chest* 138,1402–1410.

Watanabe M., Houten S. M., Matak C., Christoffolete M. A., Kim B. W., Sato H., Messaddeq N., Harney J. W., Ezaki O., Kodama T. (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 439: 484–489.

Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. (2007) Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res*. 67(3):863-7.

Yu C., Wang F., Kan M., Jin C., Jones R. B., Weinstein M., Deng C. X., McKeehan W. L. 2000. Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J. Biol. Chem*. 275: 15482–15489.

Zhang M., Chiang J. Y. 2001. Transcriptional regulation of the human sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in mediating bile acid repression. *J. Biol. Chem*. 276: 41690–41699. [PubMed: 11535594]

Zusman I, Chevion M, Kitrosski N.(1992) Effects of N'-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and deoxycholic acid on the content of free radicals in rat serum. *Exp Toxicol Pathol*. 1992;44(4):187–189.

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren für die geduldige Betreuung meiner Dissertation in Kooperation mit dem Mangelsdorf/Kliwer Labor der Department of Pharmacology am UTSW, Dallas, Texas, USA. Ich bedanke mich ebenso bei Prof. Ph.D. David Mangelsdorf für die Überlassung des Themas, und bei M.D. Ph.D. Daniel Schmidt und allen anderen Kollegen des Mangelsdorf/Kliwer Labors für ihr Knowhow. Und ich bedanke mich bei meinen Freunden und bei meiner Großfamilie für ihr Interesse am Erfolg meiner Arbeit und für ihre liebevolle Unterstützung, insbesondere Dr. Klaus Schmidt für das Korrekturlesen und Annette Schmidt für ihre organisatorische Hilfe. Die Arbeit widme ich meinen lieben Großeltern Dr. med. Leonhardt Heinrich Schmidt, Lisel Schmidt, John Emil Martin und Lore Martin.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: