

Entwicklung massenspektrometrischer Methoden zur Untersuchung des Metabolismus von Gallensäuren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

an der Universität Hamburg

Department Chemie

Institut für Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Katrin Kuprat

(geb. Wegner)

aus Waren (Müritz)

Hamburg 2017

Datum der Druckfreigabe: 10. November 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2013 bis April 2016 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sascha Rohn
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maison

Tag der Disputation: 10. November 2017

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

- Wegner K, Just S, Gau L, Mueller H L, Gérard P, Lepage P, Clavel T & Rohn S
Rapid analysis of bile acids in different biological matrices using LC-ESI-MS/MS for the investigation of bile acid transformation by mammalian gut bacteria.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409, 1231-1245, 2016
- Markova M, Pivovarova O, Hornemann S, Sucher S, Frahnw T, Wegner K, Machann J, Petzke K J, Hierholzer J, Lichtinghagen R, Herder C, Carstensen-Kirberg M, Roden M, Rudovich N, Klaus S, Thomann R, Schneeweis R, Rohn S & Pfeiffer AFH
Iso-caloric high animal or plant protein diets potentially reduce liver fat in type 2 diabetes.
Gastroenterology, 152, 571-585, 2016
- Werner P, Wegner K, John C, Worthmann A, Scheja L, Heeren J, Rohn S & Fischer M
Metabolomic Profiling: LC-MS/MS-Multimethode zur Quantifizierung von Hydroxysterolen und Gallensäuren aus biologischen Matrices.
Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 111, 198-203, 2015
- John C, Werner P, Worthmann A, Wegner K, Tödter K, Scheja L, Rohn S, Heeren J & Fischer M
A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids.
Journal of Chromatography A, 1371, 184-195, 2014
- Just S, Mondot S, Ecker J, Wegner K, Gau L, Schmidt S, Dunkel A, Hofmann T, Liebisch G, Haller D, Gérard P, Rohn S, Lepage P & Clavel T
Bile acids and fat type in diet impact metabolic responses and gut microbiota functions in mice.
(In Vorbereitung)
- Markova M, Sucher S, Wegner K, Pivovarova O, Rudovich N, Thomann R, Schneeweiss R, Rohn S, Hornemann S & Pfeiffer AFH
Extensive second meal improvements of insulin sensitivity after high protein breakfasts: a comparison of plant and animal protein in type 2 diabetes patients.
(In Vorbereitung)

Vorträge

- Rohn S, Gau L & Wegner K
Mammalian sterol metabolites – Influence of chemical structure, diet, and microbiome.
Glycolipid Meeting 2017 “Structures, Functions, and Interactions of Membrane Compounds”,
02. Juni 2017, Hamburg.
- Just S, Wegner K, Mondot M, Streidl T, Gau L, Philippe C, Héry-Arnaud G, Ecker J, Gerard P, Rohn S, Lepage P & Clavel T
Gut Bacteria of the Family Coriobacteriaceae increase white adipose tissue deposition in mice.
5. gemeinsame Tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 05.-08. März 2017, Würzburg.
- Wylensek D, Afrizal A, Abt B, Fösel B, Heinzmann S, Gau L, Wegner K, Lagkouvardos I, Schmitt-Kopplin P, Schmid J, Flisikowski K, Rohn S, Overmann J, Schnieke A & Clavel T
The pig intestinal bacterial collection allows functional studies of gut microbiota-host interactions in colorectal cancer.
5. gemeinsame Tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 05.-08. März 2017, Würzburg.
- Gau L, Wegner K & Rohn S
Sterolmetabolite – Einfluss von chemischer Struktur, Diät und gastrointestinalem Mikrobiom.
Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 27.-28. Februar 2017, Hamburg.
- Clavel T, Just S, Wegner K, Philippe C, Gerard P, Lepage P & Rohn S
Gut-derived Coriobacteriaceae increase white adipose tissue deposition in mice.
INRA – ROWETT 2016: “GUT MICROBIOLOGY: Twenty years and counting...”,
10th Joint Symposium organised by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and The Rowett Institute of Nutrition and Health, 20.-23. Juni 2016, Clermont-Ferrand, Frankreich.
- Wegner K, Just S, Lepage P, Gerard P, Clavel T & Rohn S
Einfluss von Coriobacteriaceae auf den Lipid- und Gallensäurestoffwechsel in vivo
Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG), Braunschweig, 03.-04. April 2016.
- Wegner K, Just S, Lepage P, Gerard P, Clavel T & Rohn S
Gut-derived Coriobacteriaceae increase white adipose tissue deposition in mice,
53. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE), Fulda, 02.-04. März 2016.

- Wegner K
Impact of Coriobacteriaceae-derived functions on bile acid and amino acid metabolism in vivo.
DFG-Projektentreffen *CorioFunc*, 27. Oktober 2015, Paris, Frankreich.
- Wegner K
Functions and metabolic adaptation of dominant gut bacteria of the family Coriobacteriaceae in the context of host lipid metabolism.
DFG-Projektentreffen *CorioFunc*, 18. Juni 2015, Jouy-en-Josas, Frankreich.
- Wegner K, Werner P, John C, Worthmann A, Tödter K, Scheja L, Heeren J, Fischer M & Rohn S *Metabolomic Profiling: LC-MS/MS-Multimethode zur Quantifizierung von Cholesterol und Cholesterol-Derivaten aus biologischen Matrices.*
52. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE), Halle (Saale), 11.-13. März 2015.
- Wegner K
Determination of cholesterol-derived compounds in biological fluids by LC-ESI-MS/MS.
DFG-Projektentreffen *CorioFunc*, 10. Januar 2014, Freising.

Poster

- Markova M, Sucher S, Hornemann S, Pivovarova O, Wegner K, Thomann R, Schneeweiß R, Rohn S & Pfeiffer AFH
Extensive second meal improvements of insulin sensitivity after high protein breakfasts: a comparison of plant and animal protein in type 2 diabetes patients (T2DM).
53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 11.-15. September 2017, München.
- Markova M, Hornemann S, Sucher S, Wegner K, Rohn S, Pivovarova O & Pfeiffer AFH
Methionine rich diets may improve meal related insulin sensitivity.
60. Deutscher Kongress für Endokrinologie, 15.-17. März 2017, Würzburg.
- Just S, Wegner K, Mondot M, Streidl T, Gau L, Philippe C, Héry-Arnaud G, Ecker J, Gerard P, Rohn S, Lepage P & Clavel T
Gut Bacteria of the Family Coriobacteriaceae increase white adipose tissue deposition in mice.
5. gemeinsame Tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 05.-08. März 2017, Würzburg.

- Wylensek D, Afrizal A, Abt B, Fösel B, Heinzmann S, Gau L, Wegner K, Lagkouvardos I, Schmitt-Kopplin P, Schmid J, Flisikowski K, Rohn S, Overmann J, Schnieke A, Clavel T
The pig intestinal bacterial collection allows functional studies of gut microbiota-host interactions in colorectal cancer.
5. gemeinsame Tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 05.-08. März 2017, Würzburg.
- Wegner K, Just S, Gau L, Gérard P, Lepage P, Clavel T & Rohn S
Coriobacteriaceae und fettreiche Diät - Wichtige Einflussfaktoren des Lipid- und Gallensäurestoffwechsels?
45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12.-14. September 2016, Freising.
- Just S, Wegner K, Philippe C, Gerard P, Lepage P, Rohn S & Clavel T
Gut-derived Coriobacteriaceae increase white adipose tissue deposition in mice.
INRA – ROWETT 2016: “GUT MICROBIOLOGY: Twenty years and counting...”,
10th Joint Symposium organised by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and The Rowett Institute of Nutrition and Health, 20.-23. Juni 2016, Clermont-Ferrand, Frankreich.
- Just S, Wegner K, Mondot S, Philippe C, Héry-Arnaud G, Gérard P, Rohn S, Lepage P & Clavel T
Intestinal Coriobacteriaceae increase fat depots in mice.
4. gemeinsame Tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 13.-16. März 2016, Jena.
- Wegner K, Werner P, John C, Worthmann A, Tödter K, Scheja L, Heeren J, Fischer M & Rohn S
Metabolomic Profiling: LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids in different biological matrices.
12th European Nutrition Conference (FENS), 20.-23. Oktober 2015, Berlin.
- Wegner K, Werner P, John C, Worthmann A, Scheja L, Heeren J, Fischer M, Rohn S
Metabolomic Profiling: LC-MS/MS Multimethode zur Quantifizierung von Sterolen und Gallensäuren aus biologischen Matrices.
Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft „Industrie und Überwachung im Dialog“, 09.-10. März 2015, Oldenburg.
- Wegner K, Werner P, John C, Worthmann A, Tödter K, Scheja L, Heeren J, Fischer M & Rohn S
A rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sterol derivatives and bile acids in different tissues and biofluids.
43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 22.-24. September 2014, Gießen.

- John C, Worthmann A, Bartelt A, Werner P, Wegner K, Fischer M, Scheja L & Heeren J
Cold-activated Brown Adipose Tissue Regulates Systemic Cholesterol Metabolism
4th European Lipidomics Meeting, 22.-24. September 2014, Graz.

- Wegner K, Werner P, John C, Worthmann A, Tödter K, Scheja L, Heeren J, Fischer M & Rohn S
Metabolomic Profiling: Eine neue LC-ESI-MRM-Multimethode zur quantitativen Bestimmung von 39 Sterolen in diversen biologischen Matrices.
Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG), 24.-25. März 2014, Hamburg.

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IX
Maßeinheiten & Größen	XIII
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XVI
Teil A – Einleitung	1
Teil B – Theoretischer Hintergrund	2
1 Intestinales Mikrobiom	2
1.1 Allgemeines	2
1.2 <i>Coriobacteriaceae</i>	5
2 Biochemie der Gallensäuren	7
2.1 Biosynthese	7
2.2 Chemische Eigenschaften und physiologische Relevanz	9
2.3 Bedeutung von Gallensäuren als Signal- und Modulatormoleküle	12
2.4 <i>Intestinale Modifikation durch bakterielle Prozesse</i>	16
3 Gallensäureanalytik – ein Überblick	19
Teil C – Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	21
Teil D – Ergebnisse und Diskussion	23
1 Analytik von Gallensäuren	23
1.1 Entwicklung der LC-ESI-MS/MS-Methode	23
1.1.1 Entwicklung der MRM-Methode	23
1.1.2 Entwicklung der flüssigkeitschromatographischen Methode	27
1.1.2.1 Einfluss der stationären Phase	29
1.1.2.2 Einfluss des pH-Wertes	30
1.1.2.3 Einfluss des Lösungsmittels	32
1.1.2.4 Finale Optimierung	35
1.2 Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode	36
1.2.1 Festphasenextraktion (SPE)	36
1.2.2 Extraktionsverfahren	39
1.3 Methodvalidierung	42
1.3.1 Linearität und linearer Arbeitsbereich	42
1.3.1.1 Grundkalibrierung	42
1.3.1.2 Matrixkalibrierung	46
1.3.2 Präzision	49
1.3.2.1 Wiederholungspräzision	49
1.3.2.2 Vergleichspräzision	49

1.3.3	Genauigkeit.....	49
1.3.4	Wiederfindung.....	50
1.3.5	Analytische Grenzwerte.....	51
2	Untersuchungen zum Einfluss von <i>Coriobacteriaceae</i> auf den Gallensäuren- und Lipidmetabolismus	52
2.1	<i>In vitro</i> -Fermentation	52
2.1.1	BSH-Aktivität.....	52
2.1.2	HSDH- und 7 α -Dehydroxylase-Aktivität	53
2.2	<i>In vivo</i> -Fütterungsstudie.....	55
2.2.1	Hintergrund und Ziel der Studie.....	55
2.2.2	Studiendesign	56
2.2.3	Einfluss der <i>Coriobacteriaceae</i> auf den metabolischen Status vom WAT.....	56
2.2.3.1	Makroskopische und Morphologische Veränderungen	56
2.2.3.2	Einfluss der <i>Coriobacteriaceae</i> auf den Lipidstoffwechsel im WAT.....	59
2.2.3.3	Einfluss der <i>Coriobacteriaceae</i> auf den Gallensäurenstoffwechsel im WAT.....	62
2.2.4	Einfluss der <i>Coriobacteriaceae</i> auf das Gallensäurenprofil im Caecum.....	64
2.2.5	Einfluss der <i>Coriobacteriaceae</i> auf das Gallensäurenprofil im portalen Plasma.....	69
Teil E – Zusammenfassung.....		72
Teil F – Summary.....		75
Teil G – Material und Methoden		77
1	Analytik von Gallensäuren	77
1.1	Chemikalien und biologisches Material	77
1.1.1	Herstellung von Stammlösungen sowie Multistandards.....	77
1.2	Entwicklung der LC-MS/MS-Messmethode.....	78
1.2.1	Entwicklung der MRM-Methode.....	78
1.2.2	Entwicklung des flüssigkeitschromatographischen Systems	79
1.3	Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode.....	81
1.3.1	Festphasenextraktion.....	81
1.3.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	82
1.4	Methodenvalidierung.....	83
1.4.1	Selektivität und Spezifität.....	83
1.4.2	Linearität	83
1.4.2.1	Grundkalibrierung.....	84
1.4.2.2	Matrixkalibrierung.....	84
1.4.2.3	Statistische Prüfung auf Linearität	85
1.4.3	Präzision	87
1.4.4	Genauigkeit.....	87
1.4.5	Wiederfindung.....	88
1.4.6	Analytische Grenzwerte.....	88
1.4.7	Stabilität	89

2	Untersuchungen zum Einfluss von <i>Coriobacteriaceae</i> auf den Gallensäuren- und Lipidmetabolismus	90
2.1	<i>In vitro</i> -Fermentation	90
2.1.1	Chemikalien und Bakterien.....	90
2.1.2	Experimentelles Design	90
2.1.3	Quantitative Bestimmung der Gallensäuren.....	91
2.1.3.1	Chemikalien.....	91
2.1.3.2	Probenvorbereitung.....	91
2.1.3.3	Messmethode	91
2.1.3.4	Auswertung.....	91
2.2	<i>In vivo</i> -Fütterungsstudie.....	91
2.2.1	Chemikalien und Bakterien.....	91
2.2.2	Studiendesign	92
2.2.3	Quantitative Bestimmung von Gallensäuren	93
2.2.3.1	Chemikalien.....	93
2.2.3.2	Probenvorbereitung.....	93
2.2.3.3	Messmethode	93
2.2.3.4	Auswertung.....	94
2.2.4	Quantitative Bestimmung von Fettsäuren in Fettgewebe	94
2.2.4.1	Chemikalien.....	94
2.2.4.2	Probenaufarbeitung.....	95
2.2.4.3	Auswertung.....	95
2.2.4.4	Messmethode	96
3	Statistik.....	97
3.1	Allgemeine statistische Analyse.....	97
3.2	Multivariate Datenanalyse.....	98
	Teil H – Literaturverzeichnis	99
	Teil I – Anhang	111
1	Analytik von Gallensäuren – Methodenparameter	111
2	Ergänzungen zum Teil D – Ergebnisse und Diskussion.....	116
3	Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte.....	126
3.1	Chemikalien.....	126
3.2	Verbrauchsmaterialien	128
3.3	Geräteverzeichnis	129
	Eidesstattliche Versicherung	130

Abkürzungsverzeichnis

3-DHCA	3-Dehydrocholsäure (<i>3-Dehydrocholic Acid</i>)
6,7-DKLCA	6,7-Diketolithocholsäure (<i>6,7-Diketolithocholic Acid</i>)
7-DHCA	7-Dehydrocholsäure (<i>7-Dehydrocholic Acid</i>)
6-ECDCA	6-Ethyl-Chenodeoxycholsäure (CDCA: <i>Chenodeoxycholic Acid</i>)
7-KLCA	7-Ketolithocholsäure (<i>7-Ketolithocholic Acid</i>)
7,12-DKLCA	7,12-Diketolithocholsäure (<i>7,12-Diketolithocholic Acid</i>)
12-DHCA	12-Dehydrocholsäure (<i>12-Dehydrocholic Acid</i>)
12-KLCA	12-Ketolithocholsäure (<i>12-Ketolithocholic Acid</i>)
AA	Ammonium-Addukt
<i>A. parvulum</i>	<i>Atopobium parvulum</i>
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACN	Acetonitril
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variance</i>)
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
ASBT	<i>Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter</i>
BA	Gallensäuren (<i>Bile Acids</i>)
BAT	Braunes Fettgewebe (<i>Brown Adipose Tissue</i>)
BAAT	Gallensäure-CoA:Aminosäure N-Acyltransferase (<i>Bile Acid-CoA:Amino Acid N-AcylTransferase</i>)
BP	Basispeak
BSH	Gallensalz-Hydrolase (<i>Bile Salt Hydrolase</i>)
bzw.	beziehungsweise
<i>C. aerofaciens</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>
CA	Cholsäure (<i>Cholic Acid</i>)
ca.	circa
CAD	<i>Collision Gas</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDCA	Chenodeoxycholsäure (<i>Chenodeoxycholic Acid</i>)
CE	<i>Collision Energy</i>
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CID	<i>Collision-Induced Dissociation</i>
cmc	kritische Mizellenbildungskonzentration (<i>Critical Micelle Concentration</i>)
CN	Cyanogruppe
CoA	Coenzym A
<i>Corio</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
CYP7A1	Cholesteroll-7 α -Hydroxylase
CYP8B1	Steroll-12 α -Hydroxylase
d4-CA	Deutero-Cholsäure (<i>Deutero-Cholic Acid</i>)
d4-GCDCA	Deutero-Glycochenodeoxycholsäure (<i>Deutero-glycochenodeoxycholic Acid</i>)

DAD	Dioden-Array-Detektor
DCA	Deoxycholsäure (<i>Deoxycholic Acid</i>)
dest.	destilliert
DHCA	Dehydrocholsäure (<i>Dehydrocholic Acid</i>)
DHLCA	Dehydrolithocholsäure (<i>Dehydrolithocholic Acid</i>)
DIO2	Type 2 <i>Deiodinase</i>
DP	<i>Declustering Potential</i>
DT	<i>Dwell Time</i>
<i>Egg. lenta</i>	<i>Eggerthella lenta</i>
<i>E. mucosicola</i>	<i>Enterohabdus mucosicola</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	<i>Entrance Potential</i>
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
ER α/β	Östrogenrezeptor α bzw. β (<i>Estrogen Receptor</i>)
ESI	Elektrosprayionisation
et al.	und andere (lateinisch <i>et alii</i>)
eWAT	epididymales Fettgewebe
FA	Ameisensäure (<i>Formic Acid</i>)
FAS	Fettsäuresynthase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF15/19	<i>Fibroblast Growth Factor 15/19</i>
FXR	Farnesoid Rezeptor X
FXRE	<i>FXR-Response Element</i>
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
GC	Gaschromatographie
GCA	Glycocholsäure (<i>Glycocholic Acid</i>)
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure (<i>Glycochenodeoxycholic Acid</i>)
GDCA	Glycodeoxycholsäure (<i>Glycodeoxycholic Acid</i>)
GF	keimfrei (<i>Germfree</i>)
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
GLCA	Glycolithocholsäure (<i>Glycolithocholic Acid</i>)
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
GUDCA	Glycoursodeoxycholsäure (<i>Glycoursodeoxycholic Acid</i>)
HCA	Hyochocholsäure (<i>Hyochocholic Acid</i>)
HDCA	Hyodeoxycholsäure (<i>Hyodeoxycholic Acid</i>)
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	<i>High Fat Diet</i>
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>)

HSDH	Gallensäure-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (<i>Bile Salt Hydroxysteroid Dehydrogenase</i>)
IBABP	<i>Intestinal Bile Acid-Binding Protein</i>
i.D.	Innendurchmesser
Ig A	Immunglobulin A
IS	Interner Standard
ISO-DCA	Iso-Deoxycholsäure (<i>Iso-Deoxycholic Acid</i>)
ISO-LCA	Iso-Lithocholsäure (<i>Iso-Lithocholic Acid</i>)
LA	Linearer Arbeitsbereich
LC	Flüssigchromatographie (<i>Liquid Chromatography</i>)
LCA	Lithocholsäure (<i>Lithocholic Acid</i>)
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (<i>Liquid-Liquid-Extraction</i>)
LLoD	Nachweisgrenze (<i>Lower Limit of Detection</i>)
LLoQ	Bestimmungsgrenze (<i>Lower Limit of Quantitation</i>)
LRH-1	<i>Liver Receptor Homolog-1</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
LXRE	<i>LXR-Response Element</i>
M	Methode
MeOH	Methanol
MetaHIT	<i>Metabolome of the Human Intestine</i>
Mio.	Million
MM	Minimal Medium
MMMDB	<i>Mouse Multiple Tissue Metabolome DataBase</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MRP2/3	<i>Multidrug Resistance Associated Protein 2 bzw. 3</i>
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MW	Mittelwert
mWAT	mesenteriales Fettgewebe
n/a	nicht verfügbar (<i>not available</i>)
NAFLD	nicht-alkoholische Fettleber (<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i>)
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis (<i>Non-Alcoholic Steatohepatitis</i>)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NTCP	<i>Na⁺-Taurocholate Cotransporting Pump</i>
<i>P</i>	Signifikanzniveau
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>Principal Component Analysis</i>)
PG	Prüfgrenze
Q	Quadrupol
Qal	<i>Qualifier</i>
QC	<i>Quality Control</i>
Qnt	<i>Quantifier</i>
QqQ	<i>Triple Quadrupole</i>
RE	Relativer Fehler (<i>Relative Error</i>)
RE	Umkehrphase (<i>Reversed Phase</i>)

RNS	reaktive Stickstoff-Spezies (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP	Umkehrphase (<i>Reversed Phase</i>)
RT	Retentionszeit
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (<i>Short Chain Fatty Acids</i>)
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SLE	Fest-Flüssig-Extraktion (<i>Solid-Liquid Extraction</i>)
SPE	Festphasenextraktion (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPF	spezifisch pathogenfrei (<i>Specific Pathogen Free</i>)
sWAT	subkutanes Fettgewebe
T- α -MCA	Tauro- α -Muricholsäure (<i>Tauro-α-Muricholic Acid</i>)
T- β -MCA	Tauro- β -Muricholsäure (<i>Tauro-β-Muricholic Acid</i>)
TBA	Gesamtgallensäurenkonzentration (<i>Total Bile Acid Concentration</i>)
TCA	Taurocholsäure (<i>Taurocholic Acid</i>)
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure (<i>Taurochenodeoxycholic Acid</i>)
TDCA	Taurodeoxycholsäure (<i>Taurodeoxycholic Acid</i>)
TGR5	<i>G Protein-coupled Bile Acid Receptor</i>
THDCA	Taurohyodeoxycholsäure (<i>Taurohyodeoxycholic Acid</i>)
TIC	<i>Total-Ion-Chromatogram</i>
TLCA	Taurolithocholsäure (<i>Taurolithocholic Acid</i>)
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure (<i>Tauroursodeoxycholic Acid</i>)
UDCA	Ursodeoxycholsäure (<i>Ursodeoxycholic Acid</i>)
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleichend
VGL	Vergleichsbedingung
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WAT	weißes Fettgewebe (<i>White Adipose Tissue</i>)
WD	Wiederholbedingung
XIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
z. B.	zum Beispiel
ZIEL	Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung
α -MCA	α -Muricholsäure (<i>α-Muricholic Acid</i>)
β -MCA	β -Muricholsäure (<i>β-Muricholic Acid</i>)
ω -MCA	ω -Muricholsäure (<i>ω-Muricholic Acid</i>)

Maßeinheiten & Größen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Å	Ångström
b	mittleres Begleitsignal
bar	Bar
c	Konzentration
counts	Zähleinheiten pro Zeitintervall
cps	counts per second
C _v	Verfahrensvariationskoeffizient
Da	Dalton
g	Gramm
g	Beschleunigung
k	Kilo
L	Liter
M	Mol je Liter
m	Milli
m	Meter
m	Empfindlichkeit
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
min	Minute
mol	Mol
n	Nano
p	Piko
psi	<i>Pounds per Square Inch</i>
r	Wiederholbarkeit
R ²	Bestimmtheitsmaß
S _R	Präzision
S _V	Verfahrensstandardabweichung
u	Atomare Masseneinheit
V	Volt
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Teil B – Theoretischer Hintergrund

- Abbildung B-1 Biosyntheseweg der Gallensäuren aus Cholesterol über den „klassischen“ und „alternativen“ Reaktionsweg für den humanen Organismus.
- Abbildung B-2 Allgemeine Grundstruktur von Gallensäuren.
- Abbildung B-3 Regulation der Gallensäurebiosynthese durch die nukleären Rezeptoren FXR und LXR.
- Abbildung B-4 Reaktionsschema einer HSDH-katalysierten Reaktion.

Teil D – Ergebnisse & Diskussion

- Abbildung D-1 Produkt-Ionenspektrum ausgewählter Gallensäuren je im negativen und positiven Ionenmodus.
- Abbildung D-2 Vergleich der Intensitäten des *Precursor*-Ions vor der Fragmentierung im Q1 am Beispiel von CA.
- Abbildung D-3 Relevante unkonjugierte Gallensäurenmetabolite, die als Strukturisomere vorliegen.
- Abbildung D-4 Einfluss des pH-Werts des Eluenten auf das chromatographische Verhalten von Gallensäuren.
- Abbildung D-5 Einfluss des Lösungsmittels auf das Retentionsverhalten von Gallensäuren.
- Abbildung D-6 XIC (*Extracted Ion Chromatogram*) der isomeren Verbindungen am Beispiel der freien Gallensäuren bei den dargestellten Massenübergängen (Ausschnitt).
- Abbildung D-7 Schematische Darstellung eines SPE-Versuches zur Anreicherung der Probenmoleküle an der Festphase und zur Entfernung von Störkomponenten.
- Abbildung D-8 Getestete SPE-Methoden für die Probenaufarbeitung von Gallensäuren.
- Abbildung D-9 Wiederfindungsrate ausgewählter Gallensäuren nach Festphasenextraktion.
- Abbildung D-10 Schematische Darstellung des angewandten Probenextraktionsverfahrens mittels SLE (*Solid-Liquid-Extraction*, Fest-Flüssig-Extraktion) für Fäzes-Proben.
- Abbildung D-11 Prozentuale Wiederfindungsrate von Gallensäuren nach LLE (*Liquid-Liquid-Extraction*, Flüssig-Flüssig-Extraktion) mit Methanol als Extraktionsmittel (Zellkulturnährmedium, n = 3).
- Abbildung D-12 Prüfung der Linearität im Rahmen der Grundkalibrierung (Systemlinearität) beispielhaft für TCA und TLCA.
- Abbildung D-13 Prüfung der Linearität im Rahmen der Grundkalibrierung (Systemlinearität) beispielhaft für TCA und TLCA nach Verkleinerung des Kalibrierbereiches.
- Abbildung D-14 Regressionsgerade und Residuenplot der Gallensäure CA für die Matrices Plasma und Fäzes.
- Abbildung D-15 Regressionsgerade und Residuenplot der Gallensäure CA für die Matrices Fettgewebe und Nährmedium.

- Abbildung D-16 Bakterielle Transformation von konjugierten Gallensäuren durch Vertreter der Familie *Coriobacteriaceae*.
- Abbildung D-17 Körpergewicht und Fettgewebe-zu-Körpergewicht-Verhältnis (Studienende) der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) nach diätetischer Intervention.
- Abbildung D-18 Prozentuale Anzahl der Adipozyten in der weißen Fettgewebsmasse der C57BL/6N Mäuse nach Fütterung mit BA.
- Abbildung D-19 Profil der freien Fettsäuren (FFA) im Fettgewebe (Studienende) der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) nach diätetischer Intervention.
- Abbildung D-20 Analyse des Gallensäureprofils der C57BL/6N Mäuse im weißen Fettgewebsdepot (WAT).
- Abbildung D-21 Gallensäureprofile der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) im Caecum.
- Abbildung D-22 Analyse des Gallensäureprofils der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) im portalen Plasma (Pfortader).

Teil G – Material & Methoden

- Abbildung G-1 Gradientenverlauf der flüssigkeitschromatographischen Methode.
- Abbildung G-2 Zusammenfassende Darstellung der getesteten SPE-Methoden für die Isolierung von Gallensäuren.
- Abbildung G-3 Zusammensetzung der verwendeten Diäten.
- Abbildung G-4 Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Untersuchung der metabolischen Adaption von *Coriobacteriaceae* und deren Einfluss auf den Gallensäuren- und Lipidstoffwechsel *in vivo*.

Teil I – Anhang

- Abbildung I-1 XIC der isobaren Glycin- und Taurinkonjugierten Gallensäuren bei den angegebenen Massenübergängen (Ausschnitt).

Tabellenverzeichnis

Teil B – Theoretischer Hintergrund

Tabelle B-1 Bakteriengattungen der Darmmikrobiota, die am Gallensäurenstoffwechsel beteiligt sind.

Teil D – Ergebnisse & Diskussion

Tabelle D-1 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Grundkalibrierung (Auszug).

Tabelle D-2 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Grundkalibrierung nach Verkleinerung des Kalibrierbereichs (Auszug).

Tabelle D-3 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Grundkalibration.

Tabelle D-4 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Matrixkalibrierung für die Matrices Plasma, Fäzes, Fettgewebe und Nährmedium (Auszug).

Tabelle D-5 Präzision und Genauigkeit unter Wiederholungs- (WD) und Vergleichsbedingungen (VGL) beispielhaft für die Matrix Plasma (Auszug).

Tabelle D-6 Dekonjugation von Gallensäuren durch ausgewählte Stämme der Familie *Coriobacteriaceae* unter *in vitro*-Bedingungen.

Tabelle D-7 Bildung der Oxo-Gallensäuren 3-KDCA und 12-KDCA durch Stämme der *Coriobacteriaceae* unter *in vitro*-Bedingungen.

Tabelle D-8 FFA-Profil im weißen Fettgewebe der BA-gefütterten C57BL/6N Mäuse am Studienende.

Teil G – Material & Methoden

Tabelle G-1 Chromatographiebedingungen der finalen RP-Methode für die LC-MS/MS-basierte Bestimmung von Gallensäuren.

Tabelle G-2 Chromatographiebedingungen und Geräteparameter der GC-FID-Methode.

Teil I – Anhang

Tabelle I-1 Abkürzungsverzeichnis der verwendeten Gallensäuren.

Tabelle I-2 Optimierte Parameter des massenspektrometrischen Systems für die jeweilige Gallensäure und deren Integration in die entsprechende Periode der MRM-Multimethode.

Tabelle I-3 Geräteparameter und Einstellungen des Massenspektrometers.

Tabelle I-4 Wiederfindungsraten für ausgewählte Gallensäuren nach Extraktion mit Methanol.

Tabelle I-5 Kurvenparameter der linearen Regression für die Grundkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode.

Tabelle I-6 Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Plasma.

Tabelle I-7 Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Fäzes.

Tabelle I-8	Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Fettgewebe.
Tabelle I-9	Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Nährmedium (MM).
Tabelle I-10	Präzision und Genauigkeit unter Wiederholungs- (WD) und Vergleichsbedingungen (VGL) beispielhaft für die Matrix Plasma.
Tabelle I-11	Chemikalienverzeichnis.
Tabelle I-12	Verwendete Verbrauchsmaterialien.
Tabelle I-13	Verwendete Geräte.

Teil A – Einleitung

Die Darmmikrobiota ist ein hochkomplexes Ökosystem. Zwischen den Darmbakterien und dem Wirtsorganismus bestehen enge und dynamische Wechselwirkungen. Durch protektive und metabolische Funktionen kommt der intestinalen Mikrobiota und ihren Stoffwechselprodukten eine große Bedeutung für die Gesundheit des Wirtes zu¹. Durch ihre Fähigkeit am intestinalen Metabolismus von Gallensäuren mitzuwirken, stellt das Darmmikrobiom einen wichtigen Regulator der Gallensäurehomöostase dar.

Gallensäuren bilden die wasserlösliche Untergruppe der Sterole und repräsentieren wichtige Endprodukte des Cholesterolkatabolismus im tierischen Organismus². Die enzymatische Transformation von Cholesterol zu Gallensäuren bildet den Hauptweg für den Organismus, um überschüssiges Cholesterol in einen ausscheidbaren Zustand umzuwandeln³.

Die gemeinsame Grundstruktur aller Gallensäuren stellt das Cyclopentanoperhydrophenanthren (Steran) dar, wobei an Position C-3 eine Hydroxylgruppe lokalisiert ist. Die chemische Strukturvielfalt ist durch Variationen in Anzahl, Position und Stereochemie der Hydroxylgruppen am Sterankörper begründet. Auf Grund ihres amphiphilen Charakters repräsentieren Gallensäuren bedeutende physiologische Emulgatoren, die in Form von gemischten Mizellen an der Solubilisierung von aufgenommenen Nahrungsfetten und lipophilen Substanzen wie fettlöslichen Vitaminen beteiligt sind⁴. Während der Passage im Darm können Gallensäuren von Mikroorganismen metabolisiert werden, wodurch sich ihre chemischen und physiologischen Eigenschaften verändern⁵.

Das Interesse am Gallensäurestoffwechsel ist in den letzten Jahren stetig gestiegen. Lange Zeit wurde die Bedeutung der Gallensäuren auf ihre Funktion in der Absorption, Lipolyse und Solubilisierung von diätetischen Fetten reduziert. Nach heutigem Kenntnisstand repräsentieren Gallensäuren vielmehr potente Signalmoleküle, die an der Regulierung ihrer eigenen *de novo*-Synthese sowie des Glukose-, Energie- und Lipidmetabolismus beteiligt sind^{6,7}. Fehlregulationen der Gallensäurehomöostase sowie Änderungen in der physiologischen und pathophysiologischen Zusammensetzung des zirkulierenden Gallensäurepools sind u.a. assoziiert mit der Ätiologie von degenerativen Darmerkrankungen, Gallensteinen, Darmkrebs, Typ-2 Diabetes mellitus und NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)⁸⁻¹⁰.

Die Vertreter aus der Familie der *Coriobacteriaceae* gehören zu den dominanten Besiedlern des tierischen und menschlichen Gastrointestinaltraktes denen bisher wenig Aufmerksamkeit zugekommen ist, obwohl ihnen wichtige Rollen bei der Entstehung zahlreicher Erkrankungen zugeschrieben werden. So sind sie an der Metabolisierung von Cholesterolderivaten, wie z.B. Gallensäuren und Steroidhormonen beteiligt. Diese bakterielle Transformation führt zur Bildung einer Vielzahl von Biomolekülen mit unterschiedlichen biochemischen und physiologischen Eigenschaften und beeinflusst somit maßgeblich den Stoffwechsel und die Gesundheit des Wirtes. Im Tiermodell konnte das Vorkommen von *Coriobacteriaceae* mit einer gesteigerten Cholesterolsorption im Darm und erhöhten *non*-HDL Cholesterol im Plasma in Korrelation gebracht werden¹¹. Darüber hinaus besteht ein belegter Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Bakteriums *Eggerthella lenta* und der Prävalenz von Typ-2 Diabetes mellitus^{12,13}.

Teil B – Theoretischer Hintergrund

1 Intestinales Mikrobiom

1.1 Allgemeines

Der Begriff „intestinales Mikrobiom“ repräsentiert die Summe aller im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier vorhandenen Mikroorganismen und genetischen Informationen¹. Der gesamte Darmtrakt von Säugern wird von Bakterien, Archaeen, Viren, Hefen und Protozoen mit einer großen Vielfalt besiedelt, wobei die Gruppe der Bakterien dominiert¹⁴⁻¹⁶.

Nach der Geburt erfolgt die Erstkolonisation des sterilen Darms durch Umgebungskeime. Der Verbrauch des im Darm enthaltenen Sauerstoffs durch fakultative Anaerobier und aerotolerante Bakterien führt zur Senkung des Redoxpotentials und zur Bildung eines anaeroben Milieus, wodurch aerobe Mikroorganismen durch fakultativ und strikt anaerobe Arten ersetzt werden^{17,18}. Die Entwicklung und die Zusammensetzung des Darmmikrobioms wird durch das Zusammenspiel verschiedener Komponenten wie dem maternalen Mikrobiom, Ernährungsgewohnheiten, Lebensumfeld und therapeutische Medikation (Umweltfaktoren) sowie durch physiologische und genetische Faktoren des Wirts (Entwicklung des Gastrointestinaltrakts, Peristaltik, Gallensäuren, intestinaler pH-Wert, mukosales Immunsystem, Mukosarezeptoren und mikrobielle Interaktionen) gestaltet¹⁹⁻²¹.

Die mikrobielle Besiedlung und Diversität des Darms variiert zwischen den einzelnen Kompartimenten des Gastrointestinaltraktes. Aufgrund des niedrigen pH-Werts (pH 1,5 bis 5) ist die Konzentration und Vielfalt an Mikroben im Magen und Duodenum am geringsten (10^1 bis 10^4 Bakterien/mL Nahrungsbrei). Entlang der Darmpassage steigen der pH-Wert und damit auch die Bakterienzahl auf 10^4 bis 10^8 Bakterien/mL Nahrungsbrei im Jejunum und Ileum an. Im Kolon ist die Vielfalt der Mikroorganismen (400 bis 500 Arten) und die Dichte an Darmbakterien mit 10^{12} Bakterien/g Darminhalt am höchsten^{22,23}. Das Darmmikrobiom wird quantitativ (> 99%) von den Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Actinobacteria* dominiert^{24,25}.

Durch neuste Forschungsergebnisse wurde erkennbar, dass zwischen der mikrobiellen Gemeinschaft und dem Organismus eine komplexe und dynamische Wechselwirkung besteht (Mikrobiota-Wirt-Interaktion)^{26,27}. Das intestinale Mikrobiom moduliert nachweislich nicht nur die zentralen Funktionen des Darms (Nährstoff- und Wasseraufnahme), sondern beeinflusst darüber hinaus auch die Immunfunktion, den Stoffwechsel und die Gesundheit des Wirtes^{28,29}. Mittlerweile wird das intestinale Mikrobiom als ein „eigenständiges“ metabolisch aktives Organ angesehen, welches entscheidend für die normale Entwicklung des Wirtsorganismus ist^{1,30}. Eine Alternation in der Komposition der intestinalen Mikroorganismen durch verschiedene Umwelteinflüsse zieht Veränderungen in der Physiologie des Wirtsorganismus nach sich³¹.

So weisen keimfreie Mäuse, im Vergleich zu normal kolonisierten Versuchstieren, Abweichungen auf anatomischer, physiologischer, immunologischer und metabolischer Ebene in verschiedenen Organen und Stoffwechsellagen auf^{32,33}. Die Stoffwechselaktivität der Bakterien erstreckt sich im Kolon überwiegend auf den mikrobiellen Abbau der für den Wirtsorganismus schwer verdaulichen Kohlenhydrate (z.B. Cellulose, Pektine und Xylane) zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, *Short Chain Fatty Acids*) wie Acetat, Butyrat und Propionat³⁴.

Weitere Fermentationsprodukte wie Lactat, Succinat und Ethanol werden als Zwischenprodukte der Fermentation durch Darmbakterien weiter abgebaut^{35,36}. Weiterhin sind intestinale Mikroorganismen an der Metabolisierung von Cholesterol zu Coprostanol eingebunden³⁷.

Die Darmmikrobiota ist außerdem ein wichtiger Regulator des Gallensäuremetabolismus, da intestinale Bakterien an der Dekonjugation und Dehydroxylierung von Gallensäuren beteiligt sind. Diese transformierten Biomoleküle stellen wichtige Aktivatoren für eine Reihe von nuklearen Transkriptionsfaktoren (FXR, *Farnesoid X Receptor*; LXR, *Liver X Receptor*) dar, die an der Regulation zahlreicher Stoffwechselwege mitwirken³⁸ (siehe 2.3 und 2.4). Neben den Kohlenhydraten werden auch Nahrungsproteine und endogene Sekretionsprodukte aus dem Mucus als Substrate von den intestinalen Mikroorganismen verwertet, wobei Ammoniak, Amine, Phenole und Thiole als potenziell toxische Verbindungen entstehen³⁹⁻⁴¹. Des Weiteren sind bestimmte Bakteriengattungen wie Enterobakterien und Bifidobakterien in der Lage Vitamine wie Folsäure, Biotin, Thiamin und Vitamin K zu synthetisieren⁴² sowie mit der Nahrung aufgenommene Schadstoffe wie Oxalate zu degradieren⁴³. Zusätzlich limitieren kommensale Bakterien durch den Verbrauch von essenziellen Nährstoffen und Spurenelementen die Vermehrung von Pathogenen. Unter physiologischen Bedingungen können die Interaktionen zwischen dem Darmbakterien und dem Wirtsorganismus als Symbiose angesehen werden¹.

Der Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf eine Vielzahl von metabolischen Stoffwechselwegen und die Bedeutung für den Gesundheitszustand des Organismus manifestieren sich dadurch, dass eine Vielzahl von systemischen Erkrankungen mit Veränderungen der Darmmikrobiota assoziiert ist^{44,45}. So wurden potentielle Zusammenhänge zwischen dem Darmmikrobiom und der Ätiologie chronischer Erkrankungen wie Adipositas^{46,47}, Typ-2 Diabetes mellitus^{13,48}, Morbus Crohn^{49,50}, Asthma⁵¹ und Multiple Sklerose^{30,52} postuliert. Speziell im Hinblick auf die Adaption des Körpergewichts nimmt die Zusammensetzung der Darmmikrobiota eine elementare Rolle ein^{53,54}. BÄCKHED et al. (2007) konnten demonstrieren, dass keimfreie Mäuse unter konstanter fett- und kohlenhydratreicher Ernährung keine Symptome von Fettleibigkeit einwickelten⁵⁵.

Übergewicht ist assoziiert mit einem veränderten Darmmikrobiom. Die Diversität der Darmmikrobiota ist bei adipösen im Vergleich nicht-adipösen Menschen signifikant reduziert^{38,56,57}. So weisen übergewichtige Personen eine höhere Besiedlung mit Bakterien des Phylum *Firmicutes* im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Unter fett- und kalorienreduzierter Diät veränderte sich das Spektrum zu Gunsten der *Bacteroidetes*^{25,58}. In Transplantationsstudien mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei der Übertragung der Mikrobiota der adipösen Mäuse auf normal gewichtige Kontrolltiere bei diesen trotz reduzierter Nahrungsaufnahme Fettleibigkeit induziert werden konnte^{58,59}. Daran wird deutlich, dass die Ernährung auch wesentlich die Zusammensetzung und Aktivität der Darmmikroben beeinflusst und somit neben direkten ernährungsphysiologischen Effekten, indirekt die Entstehung von Adipositas und Typ-2 Diabetes mellitus steuert⁶⁰⁻⁶².

Darmbakterien tragen aufgrund der Metabolisierung von Nahrungsbestandteilen nicht nur zum gesamten Energieumsatz und Stoffwechsel bei, gleichzeitig stimulieren SCFA v.a. Butyrat die Proliferation und Differenzierung der intestinalen Epithelzellen⁶³. Obwohl der Gastrointestinaltrakt mikrobiell dicht besiedelt ist, treten Entzündungen äußerst selten auf. Um ein unkontrolliertes Eindringen der luminalen Darmkeime in das Körperinnere zu verhindern, ist der gesamte Darmtrakt lumenabwärts mit Epithelzellen ausgekleidet, die eine physikalische und immunologische Schutzbarriere zwischen den Mikroben sowie dem Wirtsorganismus ausbilden⁶⁴.

Die Darmbarriere, als komplexe funktionelle Einheit, ermöglicht einerseits die gerichtete Aufnahme von Nährstoffen sowie den Wasser- und Elektrolytaustausch durch das Epithel.

Auf der anderen Seite unterbindet sie die transepitheliale Einwanderung potentiell schädlicher Stoffe sowie pathogener Mikroorganismen und beugt damit indirekt einer dauerhaften Besiedlung des Gastrointestinaltrakts durch Pathogene vor⁶⁵. Die Epithelzellen bilden eine Schicht aus, die über *Tight Junctions* untereinander verbunden sind, so dass der trans- und parazelluläre Transport gewährleistet wird⁶⁶. Das Epithel sekretiert vorwiegend digestive Effektoren wie Lysozym, Laktoferrin und Defensine, die antimikrobiell wirken. Abgesonderte Mucine aus den Becherzellen verhindern die Interaktion der Bakterien mit den Epithelzellen, in dem sie eine azelluläre Mukosa bilden, welche die Epithelzellschicht überzieht^{67,68}. Zusätzlich sind im Epithel M-Zellen lokalisiert, die Antigene von pathogenen und kommensalen Bakterien sowie von Nahrungsbestandteilen aufnehmen und so antigen-spezifische Immunantworten initiieren können⁶⁹.

Im Bereich des Gastrointestinaltraktes erfolgt ein ständiger Kontakt zwischen dem Wirt mit einer Vielzahl an Mikroorganismen, aber auch mit Antigenen aus der Nahrung, die eine Präsenz eines immunologischen Abwehrsystems erfordern⁷⁰. Der Großteil der täglich produzierten Immunoglobuline wird in den Gastrointestinaltrakt sezerniert⁷¹. Das Darmepithel bildet mit denen in das Darmlumen sezernierten Immunoglobulin A (IgA)-Antikörpern eine erste Barriere aus und trägt damit zur antigenspezifischen Neutralisierung luminaler Schadstoffe und Mikroben bei⁷². Gegen Antigene, die diese Barriere dennoch überwinden, wird eine gezielte Immunreaktion des Darmimmunsystems eingeleitet. Das lymphatische Gewebe GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) setzt sich auf der induktiven Seite mit den PEYER'schen Plaques und isolierten lymphoiden Follikel zusammen und ist reich an Antigen-präsentierenden T-Zellen, welche die Immunantwort regulieren, und B-Zellen, welche nach Aktivierung zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen proliferieren⁶⁹.

Die Präsenz einer aktiven Mikrobiota trägt entscheidend zur Ausbildung der spezifischen und unspezifischen Immunantwort des darmassoziierten Immunsystems bei. Gleichzeitig hält der Organismus in einer feinen Balance eine mutualistische Wechselbeziehung mit den kommensalen Bakterien der Mikrobiota aufrecht⁷⁰. Dabei entwickelt sich gegen die Kommensalen sowie die Vielzahl von Nahrungsmittelantigenen eine Reihe von Toleranzen aus. Kommt es zu einer Dysregulation dieser Homöostase kann es zu Veränderung in der epithelialen Differenzierung, zur Schwächung und Reduktion der intestinalen Barriere sowie zur verstärkten Penetration von Bestandteilen der normalen Mikrobiota in die Mukosa kommen, was eine verstärkte Immunaktivierung des GALT induziert. Die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), welche durch eine Überreaktion des Immunsystems gegenüber der intestinalen Mikrobiota hervorgerufen wird und Darmkrebs sind die Folge^{10,49,51}.

1.2 Coriobacteriaceae

Das Darmmikrobiom ist ein hochkomplexes Ökosystem. Bisher ist das wahre Ausmaß der mikrobiellen Diversität im Darm unbekannt. Zudem sind viele Spezies nicht vollständig charakterisiert, da es oftmals daran scheitert diese *ex vivo* zu kultivieren. Die Mitglieder der Familie der *Coriobacteriaceae* gehören zu den dominanten Darmbesiedlern denen bisher wenig Aufmerksamkeit zugekommen ist, obwohl sie im Darm wichtige metabolische Aufgaben erfüllen. So sind sie an der Metabolisierung von Gallensäuren und Steroidhormonen, sowie an der Biotransformation von Phytoöstrogenen beteiligt. Speziell Störungen des Gallensäurenstoffwechsels sind mit Fehlfunktionen der Darmbarriere und der Ätiologie degenerativer Darmerkrankungen assoziiert⁷³ (siehe 2.2 und 2.3). Zudem konnte in einem Tiermodell aufgezeigt werden, dass ein Auftreten der Spezies *Eggerthella* und *Enterohabdus* mit einer gesteigerten Cholesterolsorption im Darm und einem gesteigerten hepatischen Triacylglycerolspiegel in Mäusen sowie einer höheren Konzentration an *non*-HDL (*High-Density Lipoprotein*) Cholesterol im Plasma von Hamstern assoziiert ist^{74,75}. Darüber hinaus deckten Daten aus dem MetaHIT (*Metabolome of the Human Intestine*)-Konsortium auf, dass die Prävalenz von *Eggerthella lenta* (*Egg. lenta*), mit dem Auftreten von Typ-2 Diabetes mellitus in Verbindung gebracht werden kann¹³, was die Notwendigkeit aufzeigt, die physiologische Rolle der *Coriobacteriaceae* im Wirtsorganismus und deren Einfluss auf den Lipidstoffwechsel näher zu studieren.

Coriobacteriaceae sind eine Unterklasse innerhalb der Ordnung *Coriobacteriales*, die dem Phylum der *Actinobacteria* zugerechnet wird. Die Familie wurde erstmals 1997 von STACKEBRANDT et al. beschrieben⁷⁶. Seither wurden fortlaufend neue Arten entdeckt. Zurzeit werden 30 Spezies, die zu den folgenden Gattungen gehören, den *Coriobacteriaceae* zugerechnet: *Adlercreutzia*, *Asaccharobacter*, *Atopobium*, *Collinsella*, *Coriobacterium*, *Cryptobacterium*, *Denitrobacterium*, *Eggerthella*, *Enterohabdus*, *Gordonibacter*, *Olsenella*, *Paraeggerthella*, *Parvibacter* und *Slackia*. Die unbegeißelten (Ausnahme: *Gordonibacter pamelaeeae*), nicht-sporenbildenden, mesophilen (Optimum: 37 °C) Stäbchen oder Kokken (einzellig, gepaart oder kettenförmig) sind gram-positiv, strikt anaerob, Oxidase-negative, nicht-hämolytisch und weisen fast ausnahmslos einen hohen Guanin- und Cytosin-Gehalt auf¹¹. Sie stellen dominante Besiedler des humanen und tierischen Körpers vor allem des Gastrointestinaltraktes sowie der Mundhöhle dar. *Coriobacteriaceae* können als Pathobionten angesehen werden, die einerseits aufgrund ihrer metabolischen Eigenschaften wichtige, harmlose Mitglieder der kommensalen Bakteriengemeinschaft darstellen, welche aber unter bestimmten Umweltbedingungen in die Entstehung verschiedener pathologischer Krankheitsbilder wie CED, Darmkrebs, Bakteriämie und Parodontitis involviert sein können¹¹.

Sowohl das Vorkommen als auch die Funktionen von *Coriobacteriaceae* zeigen, dass der Lipidstoffwechsel einen geeigneten Kontext darstellt, um die vielfältigen Mikroben-Wirt-Interaktionen zu untersuchen. Daher wurden vier dominante Stämme mit charakteristischen metabolischen Merkmalen selektiert, um in *in vitro*- und *in vivo*-Testansätzen die *Coriobacteriaceae*-assoziierten Eigenschaften studieren zu können:

Coriobacteriaceae üben einen großen Einfluss auf den Gallensäurestoffwechsel aus, da sie in der Lage sind freie, primäre Gallensäuren zu dehydrieren und dehydroxylieren. ***Eggerthella lenta*** (*Egg. lenta*) verfügt über verschiedene Hydroxysteroiddehydrogenasen ($3\alpha/\beta$ - und 12α -HSDH), die eine stereospezifische Oxidation und Epimerisierung primärer Gallensäuren unter Bildung eines stabilen Oxo-Intermediats katalysieren. Vermutlich stellt die Transformation einerseits eine Energiequelle für die Bakterien dar, andererseits wird die Konzentration an antimikrobiell wirkenden freien Gallensäuren dadurch verringert⁷⁷ (siehe 2.4). *Egg. lenta* weist zudem die Fähigkeit auf Steroidhormone wie Deoxycorticosteron zu dehydroxylieren, wodurch Progesteron gebildet wird⁷⁸. Im Rahmen einer Metagenomanalyse von 350 Menschen identifizierten Qin et al. (2012) *Egg. lenta* als eine der Spezies, die mit dem Auftreten von Typ-2 Diabetes mellitus in Korrelation gebracht werden kann¹³. Zudem sind einige Stämme von *Egg. lenta* in der Lage, die Phytoöstrogene Enterodiol und Enterolacton zu synthetisieren⁷⁹. Diese werden über eine Kaskade an verschiedene Reaktionen aus pflanzlichen Lignan durch bakterielle Transformation im Darm gebildet. Ihnen werden protektive Eigenschaften hinsichtlich der Entstehung und des Wachstums von Karzinomzellen nachgesagt⁸⁰.

Collinsella aerofaciens (*C. aerofaciens*) zählt zum bakteriellen Kerngenom⁸¹. Mit etwa 10^{10} Zellen/g Fäzes ist *C. aerofaciens* das am häufigsten vorkommende Bakterium in der humanen intestinalen Mikrobiota⁸². Es besitzt eine 7β -HSDH-Aktivität, wodurch es an Bildung von Oxo-Gallensäuren beteiligt ist⁷⁷ (siehe 2.4).

Enterorhabdus mucosicola (*E. mucosicola*) wurde erstmalig 2009 aus der ilealen Mukosa einer Maus isoliert und charakterisiert⁸³. *Enterorhabdus* spp. wurden wiederholt in 16S-rRNA-Gensequenz-Datensätzen aus dem Maus-, Menschen- und Rinderdarmtrakt gefunden, was für ein weitverbreitetes Auftreten in verschiedenen Darmökosystemen spricht. Darüber hinaus ist das Auftreten mit einer gesteigerten Cholesterolaufnahme im Darm sowie erhöhten *non*-Plasma-HDL und Lebergewicht in Hamstern verbunden⁷⁵. Ferner weist *E. mucosicola* die Eigenschaft auf das Phytoöstrogen Daidzein im Darm durch mikrobielle Biotransformation in Equol umzuwandeln⁸⁴. Equol besitzt eine leichte Östrogenaktivität und kann, im Gegensatz zu Daidzein, an die beiden Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ binden. Der Verbindung werden zahlreiche präventive Eigenschaften u.a. gegen kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose, Prostata- und Brustkrebs zu gesprochen. Jedoch besitzen nur ca. 30% der Menschen die Fähigkeit Equol zu produzieren⁸⁵. Neben dem Lebensalter und der Darmmotilität, spielt die Zusammensetzung des Darmmikrobioms eine wichtige Rolle⁸⁶. Nach heutigem Kenntnisstand sind zehn Bakterienstämme bekannt, die Equol aus Daidzein bilden können, wovon neun zur Familie der *Coriobacteriaceae* gerechnet werden¹¹.

Als Letztes wurde ***Atopobium parvulum*** (*A. parvulum*) als eines der dominantesten Milchsäurebakterien im tierischen und menschlichen Gastrointestinaltrakt, welches mit hauptverantwortlich für die Verwertung von Proteinen im Darm ist, ausgewählt⁸⁷. Zusätzlich ist bereits die komplette Genomsequenz publiziert⁸⁸.

2 Biochemie der Gallensäuren

2.1 Biosynthese

Die Leber ist das zentrale Organ des Cholesterolfstoffwechsels. Neben der *de-novo* Synthese findet parallel in den perizentralen Hepatozyten der Abbau zu Gallensäuren über einen multienzymatischen Reaktionsweg statt. Das Sterangerüst kann vom Organismus nicht gespalten werden, daher kann Cholesterolf nur unverändert oder in Form seines hydrophilen Derivats, den Gallensäuren, über den renalen oder enteralen Weg ausgeschieden werden. Die Gallensäurenbiosynthese kann grundsätzlich über zwei Reaktionswege erfolgen.

Beim „klassischen“ bzw. „neutralen“ Weg erfolgt die Umwandlung des Substrats ausschließlich in den Hepatozyten. Der initiiierende und zugleich geschwindigkeitsbestimmende Schritt stellt die 7 α -Hydroxylierung dar, welche durch das Enzym Cholesterolf-7 α -hydroxylase (CYP7A1) katalysiert wird. Anschließend wird die β -Hydroxylgruppe am C-3 des Steranrings epimerisiert (HSD3B7 und AKR1C4) und die Doppelbindung am Ring B hydriert (AKR1D1). Durch die Addition einer weiteren Hydroxylgruppe an C-6 oder C-12 des Steroidnukleus werden Muricholsäure (MCA, *Muricholic Acid*, z.B. β -MCA: 3 α , 6 β , 7 α -Trihydroxycholansäure) und Cholsäure (CA, *Cholic Acid*, bzw. 3 α , 7 α , 12 α -Trihydroxycholansäure) generiert.

Beim „alternativen“ bzw. „sauren“ Pfad wird die Reaktion durch die Enzyme Sterolf 27-hydroxylase (CYP27A1), Cholesterolf-24-hydroxylase (CYP46A1) oder Cholesterolf-25-hydroxylase (CH25H) eingeleitet. Die resultierenden Hydroxysterole, 27-, 24- und 25-Hydroxycholesterolf, werden durch eine von zwei Hydroxycholesterolf-7 α -hydroxylasen (CYP7B1 oder CYP39A1) hydroxyliert. Der alternative Weg findet hauptsächlich im Gehirn statt und trägt nur im geringen Maß von ~ 9% zur Biosynthese von Gallensäuren bei^{89,90}.

Der oxidative Abbau der Seitenkette läuft für beide Biosynthesewege identisch ab. Das Reaktionsprodukt wird zunächst am C-27 hydroxyliert und die Hydroxylgruppe zur Carboxylgruppe oxidiert, welche durch Verknüpfung mit Coenzym A aktiviert und anschließend als Propionyl-CoA (C3-Fragment) abgespalten wird. Somit wird die typische Struktur der primären, humanen Gallensäuren CA und Chenodeoxycholsäure (CDCA, *Chenodeoxycholic Acid*, 3 α , 7 α -Dihydroxycholansäure) mit einer Carboxylgruppe an Position C-24 erhalten (vgl. Abbildung B-1 und B-2). Beim Menschen stellen CA und CDCA die primären Reaktionsprodukte dar, wohingegen bei Nagern überwiegend CA und β -MCA gebildet werden^{2,89,91,92}.

Vor der biliären Exkretion wird der Großteil der Gallensäure (ca. 98%) postsynthetisch als Säureamid an der Carboxylgruppe mit Taurin oder Glycin durch eine Gallensäure-CoA:Aminosäure N-Acyltransferase (BAAT, *Bile Acid-CoA:Amino Acid N-Acyltransferase*) verestert, wodurch die Wasserlöslichkeit und das Vermögen zur Mizellenbildung gesteigert wird^{89,93}. Die Konjugation mit Taurin wird bei Nagetieren bevorzugt, während beim Menschen das quantitative Verhältnis auf Seiten der Glycin-konjugierten Gallensäuren liegt^{94,95}. Weiterhin wird durch die N-Acylamidierung der pK_s-Wert auf ca. 2 erniedrigt, so dass die Gallensäuren beim physiologischen pH-Wert im Dünndarm von 7 - 8 vollständig ionisiert, als sogenannte Gallensalze vorliegen⁷⁷. Aufgrund ihrer Molekülgröße und Polarität können sie nicht mehr durch passive Diffusion über die Zellmembranen der Epithelzellen aufgenommen werden. Das Resultat ist eine erhöhte Konzentration an Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit und im intestinalen Lumen^{2,3}.

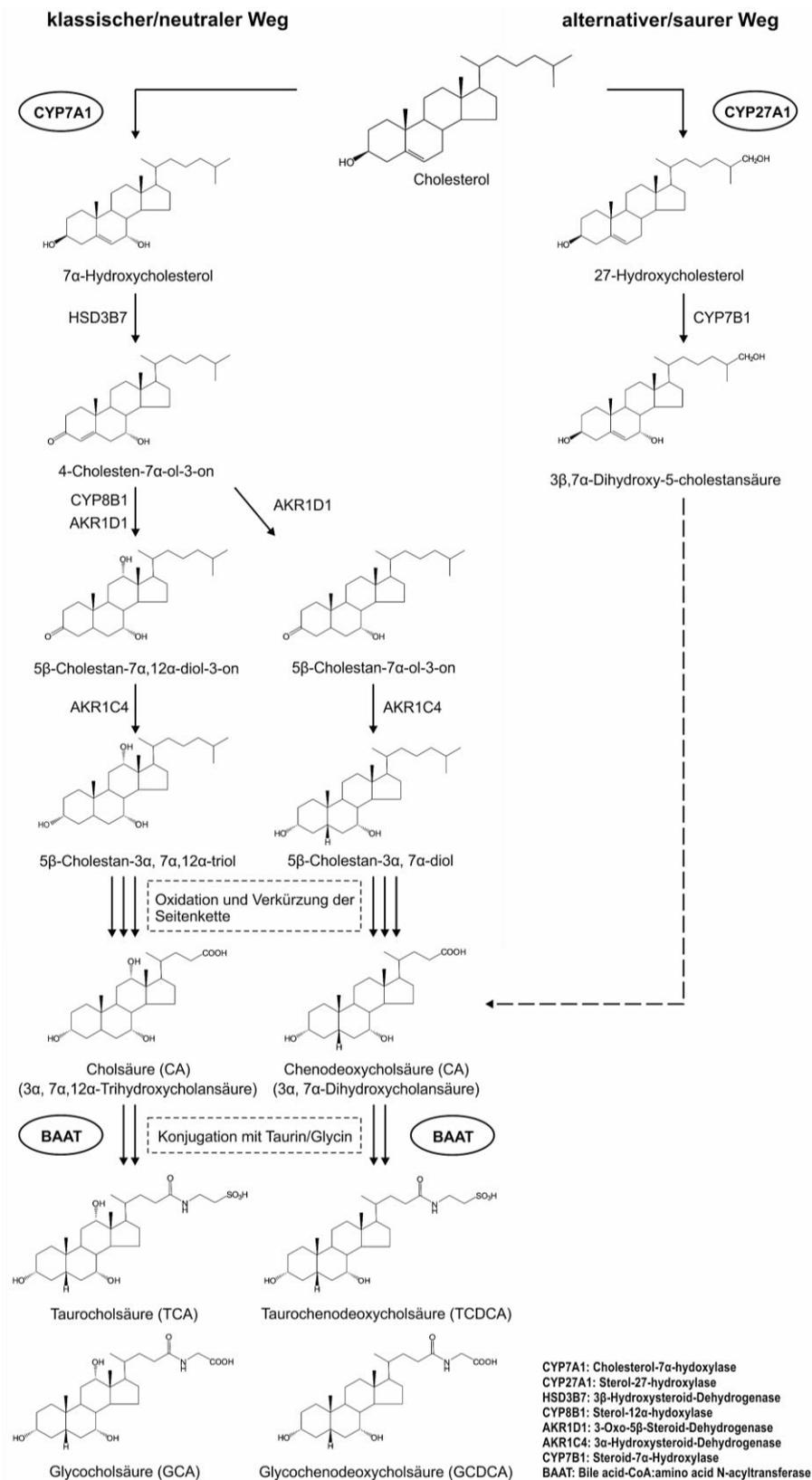


ABBILDUNG B-1 Biosyntheseweg der Gallensäuren aus Cholesterol über den „klassischen“ und „alternativen“ Reaktionsweg für den humanen Organismus. Die Reaktionskaskade startet beim „klassischen“ Weg mit der 7 α -Hydroxylierung (CYP7A1) von Cholesterol. Wird das Reaktionsprodukt im Anschluss an Position C-12 hydroxyliert, endet der Stoffwechselweg mit der Bildung von CA im anderen Falle wird CDCA generiert. Beim „alternativen“ Pfad wird im initiiierenden Schritt Cholesterol am C-27 hydroxyliert und die Seitenkette in den Folgeschritten verkürzt. Im finalen Schritt erfolgt die Konjugation mit Taurin (bevorzugt im murinen Organismus) oder Glycin (präferiert beim Menschen). (Darstellung nach RUSSELL (2003)⁸⁹ und CHIANG (1998)⁹²)

Auf der kanalikulären Seite der Hepatozyten erfolgt die Exkretion der monovalenten Gallensäuren über das Protein BSEP (*Bile Salt Export Pump*), wohingegen die konjugierten, divalenten Gallensäuren über das *Multiple Resistance Associated Protein 2* (MRP2) in die Gallenblase ausgeschieden werden⁹⁶.

2.2 Chemische Eigenschaften und physiologische Relevanz

Gallensäuren sind amphiphile, oberflächenaktive Moleküle bestehend aus einem lipophilen Steroid-Gerüst mit polaren Hydroxylgruppen sowie einer hydrophilen Seitenkette³. Die hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften variieren in Abhängigkeit der Substituenten. Das Ringsystem ist vollständig gesättigt. Zudem ändert sich bei der Gallensäurenbiosynthese aus Cholesterol die Konfiguration des A- und B-Ringes von *trans*- zur *cis*-Konformation, wodurch alle polaren funktionellen Gruppen auf der gleichen Seite des Moleküls liegen, sodass die größtmögliche Amphiphilie erreicht wird. Die chemische Strukturvielfalt der Gallensäuren ist durch Variationen in Anzahl, Position, sowie Isomerie der Hydroxylgruppen am Steroid-Nukleus begründet. Die Hydrophilie wird durch Konjugation mit den Aminosäuren Taurin und Glycin am C-24 erhöht².

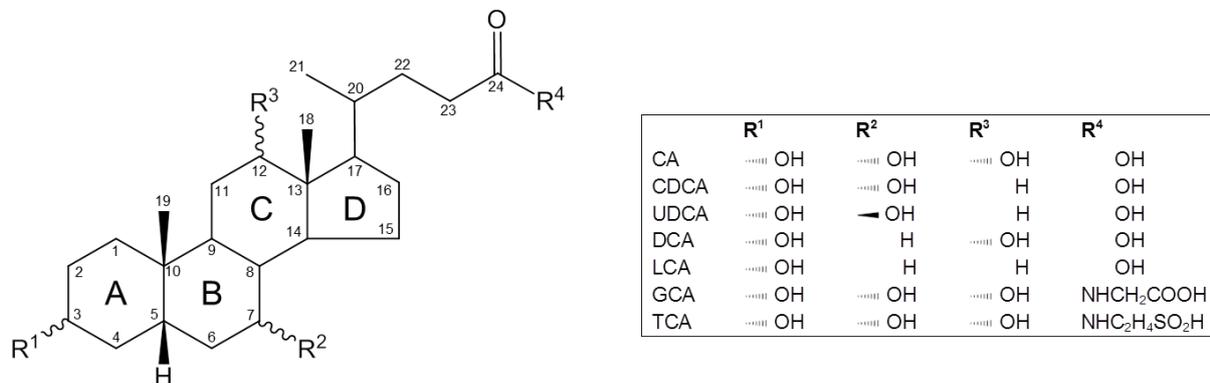


ABBILDUNG B-2 Allgemeine Grundstruktur von Gallensäuren. Die Bedeutung der Abkürzungen ist in Teil I – Anhang Nr. 1 Tabelle I-1 angegeben.

Auf Grundlage dieser strukturellen Besonderheit kann die Hauptfunktionen der Gallensäuren abgeleitet werden. Im Darm fungieren sie als essenzielle Detergentien, um aufgenommene Nahrungslipide und fettlösliche Vitamine durch Mizellenbildung zu solubilisieren, so dass deren exogener Abbau und Resorption erleichtert wird⁴.

Im weiteren Sinne verringert die Mizellenbildung die Konzentration an freien Gallensäuren und beugt damit präventiv Schädigungen an der Epithelzellmembran vor^{4,93}. Gallensäuren sorgen zusätzlich als entscheidende physiologische Kraft für den hepatischen Gallensäurenfluss und unterstützen den Wasser- und Elektrolyttransport in Dünn- und Dickdarm⁹⁷.

Gallensäuren bilden neben Wasser (82%) den Hauptanteil der Gallenflüssigkeit. Weitere Minor-komponenten sind Phospholipide, Cholesterol, Bilirubin, Elektrolyte (Na, Cl, K) und in geringen Mengen Tocopherol^{2,93}. Mit einem pH-Wert zwischen 7.4 und 8.5 ist das Gallensekret dem Blutplasma annähernd isoton. Während der Lagerung werden Wasser und Elektrolyte entfernt und die Flüssigkeit um den Faktor 3 bis 6 konzentriert. Die Konzentration an Gallensäuren in der Gallenblase liegt bei $\geq 300 \text{ mM}$ ^{2,93}.

Oberhalb der kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC, *Critical Micelle Concentration*) bilden Gallensäuren gemeinsam mit den Phospholipiden gemischte Mizellen, die das unlösliche Cholesterin in Lösung halten und somit erst seine biliäre Exkretion ermöglichen^{98,99}.

Bei der Nahrungsaufnahme wird Cholezystokin – ein in der Duodenalschleimhaut gebildetes Polypeptid – ausgeschüttet, das die Kontraktion der Gallenblase anregt, woraufhin die Gallenflüssigkeit in den Zwölffingerdarm (Duodenum) sekretiert wird⁹⁸. Die Verdauung der Lipide im Chymus beginnt mit der Absorption der Gallensäuren und Phospholipide an die Oberfläche der Triacylglycerole, wodurch die Oberflächenflächenspannung herabgesetzt wird. Die aus der Bauchspeicheldrüse freigesetzte Pankreaslipase lagert sich an der Grenzfläche an und hydrolysiert die Triacylglycerole unter Bildung von Mono- und Diacylglycerolen, sowie freien Fettsäuren. Gemischte Mizellen, die überwiegend aus Gallensäuren bestehen, nehmen die hydrophoben Bestandteile des Lipidabbaus auf und diffundieren an die Darmwände. Erst durch die Mizellenbildung wird der Transport durch das wässrige Milieu des Darmlumens an die Enterozytenoberfläche ermöglicht, wobei freie Fettsäuren, Mono- und Diacylglycerole von den Dünndarmzellen resorbiert werden können. Anschließend werden sie zusammen mit Cholesterin an Protein gebunden, in Chylomikronen und VLDL (*Very Low-Density Lipoproteins*) gespeichert und über die Lymphbahnen weitertransportiert. Die Gallensäuren verbleiben im Darmlumen und werden im distalen sowie terminalen Ileum über passive Mechanismen als auch carriervermittelt über NTCP (*Na⁺-Taurocholate Cotransporting Pump*) und ASBT (*Apical Sodium-Bile Acid Transporter*) nahezu vollständig rückresorbiert (~ 95%) und – nach dem basolateralen Transfer durch den Transporter OST α/β (*Organic Solute Transporter*) und MRP3 (*Multidrug Resistance Protein 3*) – über die Pfortader zur Leber transportiert¹⁰⁰.

Der Gallensäurenpool unterliegt einer sich ständig wiederholenden Exkretion und Reabsorption. Nur ein geringer Anteil ~ 0.2 - 0.6 g Gallensäuren werden unter physiologischen Bedingungen über die Fäzes aus dem Organismus eliminiert. Der menschliche Organismus besitzt einen natürlichen Gallensäurenpool von ~ 2 - 4 g, der täglich 6 - 10 Mal zwischen Leber, Galle und Darm im sogenannten enterohepatischen Kreislauf zirkuliert¹⁰¹.

Der biliären Exkretion kommt weiterhin eine wichtige Funktion bei der Entgiftung des Organismus zu, da über die Gallenflüssigkeit auch Metabolite von Arzneistoffen, Hormone, Schwermetallionen und Gifte ausgeschieden werden⁹³.

Der amphiphile Charakter, welche die Gallensäuren zu starken Detergentien macht, ist gleichzeitig auch für deren toxikologischen Eigenschaften verantwortlich, vor allem wenn sie in abnormalen Konzentrationen vorliegen⁹³. Aufgrund ihrer amphiphatischen Struktur wirken Gallensäuren sich negativ auf die Membranintegrität aus. Weiterhin bedingen zu hohe Konzentrationen die Dissoziation von integralen Membranlipiden, was final die Lyse und Apoptose der Zelle zur Folge hat¹⁰².

Verallgemeinert gilt, je hydrophober die Gallensäure, desto höher ist ihr zytotoxisches Potential. Die Konjugation mit Taurin und Glycin in der Leber ist daher von immenser Bedeutung, da die Toxizität im physiologischen Konzentrationsbereich signifikant gemindert wird⁹³. Bereits kleine Veränderungen in der Struktur (z.B. Anzahl der Hydroxylgruppen, Art der N-Acylamidierung) und der Stereochemie haben einen wesentlichen Einfluss auf die Stärke der Zytotoxizität.

Während GCDCA (*Glycochenodeoxycholic Acid*) dosisabhängig in den Hepatozyten *in vitro* Apoptose induziert, konnte beim Taurin-Konjugat (TCDCa, *Taurochenodeoxycholic Acid*) diese Wirkung nicht nachgewiesen werden^{103,104}.

Durch einen Wechsel der Konfiguration der 7 α -Hydroxylgruppe in die β -Position wird aus der zytotoxischen Gallensäure CDCA die hydrophilste Dihydroxygallensäure UDCA (*Ursodeoxycholic Acid*) gebildet. Diese wird in der Medizin auf Grund ihrer litholytischen Eigenschaften bei der Therapie und Heilung chronischer Lebererkrankungen und zum Auflösen von Cholesterolgallensteinen eingesetzt¹⁰⁵. Die Entstehung von Gallensteinen ist die Folge einer Disproportion der Gallenflüssigkeit, d.h. eine Verschiebung des Lösungsgleichgewichts zwischen Gallensäuren und den gelösten, wasserunlöslichen Substanzen (v.a. Cholesterol) zu Gunsten einer hydrophoberen Galle¹⁰⁶. Manifestiert wird die genannte Fehlkomposition der Gallenflüssigkeit durch Übergewicht, Diabetes und cholesterolreiche Ernährung¹⁰⁷. Durch die Gabe von UDCA wird dem Ungleichgewicht entgegengewirkt und das Verhältnis zu einer hydrophileren Gallenflüssigkeit verschoben. Zudem hemmt UDCA die Cholesterolresorption im Darm und vermindert die Cholesterolsekretion in die Galle. Unter physiologischen Bedingungen macht UDCA lediglich ca. 3% des Gesamtgallensäurepools aus¹⁰⁸.

Eine neue Therapiemöglichkeit von Gallensteinen stellt die Behandlung mit β -MCA dar. Ihr Vorkommen ist ausschließlich auf Nagetiere beschränkt; der menschliche Organismus kann β -MCA nicht metabolisieren. Im Gegensatz zu UDCA weist β -MCA eine weitere β -Hydroxylgruppe an C-6 auf, wodurch die Hydrophilie erhöht ist^{109,110}.

Durch die bakterielle 7 α -Dehydroxylierung entstehen im Kolon aus den primären Gallensäuren CA und CDCA die sekundären Gallensäuren DCA (*Deoxycholic Acid*) und LCA (*Lithocholic Acid*) als bakterielle Stoffwechselprodukte (siehe 2.4). Bereits 1940 wurde das tumor-fördernde Potenzial von Gallensäuren beschrieben¹¹¹. Neuste Forschungsergebnisse zeigen, dass vor allem die sekundären Gallensäuremetabolite DCA und LCA in die Entstehung von Karzinomen im Darmtrakt verwickelt sind. Darmkrebs ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung (Stand: 2015)¹¹². Die molekularen Mechanismen, welche die zytotoxischen Effekte vermitteln, sind sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt. DCA und LCA können bei hohen physiologischen Konzentrationen die Bildung von reaktiven Sauerstoff- (ROS, *Reactive Oxygen Species*) und Stickstoff-Spezies (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) fördern, welche DNA-Schäden, Apoptose und Mutationen verursachen¹¹³⁻¹¹⁵.

Im Gegensatz zu DCA weist LCA eine geringe Löslichkeit auf und wird überwiegend als Glycin- bzw. Taurinkonjugat ausgeschieden¹¹⁶. DCA wird über passive Diffusion im Kolon absorbiert und dem Gallensäurepool wieder zugefügt. Da der Organismus nicht in der Lage ist, in der Leber mittels einer 7 α -Hydroxylierung aus DCA die hydrophile Gallensäure CA zu bilden, kann die genannte sekundäre Gallensäure bis zu 40% des zirkulierenden Gesamtgallensäurepools ausmachen¹¹⁷. Eine dauerhafte bzw. eine sich wiederholende Exposition des Darmepithelgewebes mit Gallensäuren, speziell sekundären Gallensäuren, kann zur Genese von Krebszellen führen. Allerdings scheinen einige Gallensäuren den zytotoxischen Eigenschaften anderer protektiv entgegenzuwirken. UDCA unterbindet die Produktion von ROS und schützt die Zellen der Darmwand vor den schädigenden Wirkungen von DCA¹¹⁸.

Weiterhin zeigten SCHMUCKER et al. (1990), dass die Konzentration der toxischen Gallensäuren DCA und CDCA in den Leberzellen mit dem Grad der Leberschädigung in einen Zusammenhang gebracht werden kann¹⁰³. Ferner ist DCA in die Entstehung von Leberkarzinomen verwickelt¹¹⁹. Das Glycinkonjugat GDCA wurde als Promoter für die Genese cholestatischer Lebererkrankungen identifiziert. Hierbei kommt es aufgrund des verminderten Ausscheidungsvermögens von Gallensäuren und trotz einer durch *Feedback*-Regulation gehemmten Syntheserate zu einer Akkumulation von Gallensäuren in der Leber (siehe 2.1). Kompensatorisch wird die Exkretion über die Nieren gesteigert, wodurch die hydrophoben Gallensäuren vermehrt sulfatiert und glucuronidiert werden müssen.

Der wichtigste Faktor, der für ein steigendes Level an sekundären Gallensäuren verantwortlich ist, stellt die Nahrung dar. Bedingt durch den Verzehr von fett- und kohlenhydratreicher Kost werden vermehrt Gallensäuren in das intestinale Lumen sekretiert, wodurch eine gesteigerte Bildung von sekundären Gallensäuremetaboliten mit karzinogenem und mutagenem Potenzial induziert wird^{114,120}. Aufgrund deren schädigenden Wirkung kommt es zu einer erhöhten Zellproliferation und Mutationen im Kolonepithel-Gewebe. Darüber hinaus bremst eine fettreiche Nahrung den Durchgang des Nahrungsbreis durch die Magen-Darm-Passage, womit das Kolonepithel dem Kontakt mit den sekundären Gallensäuren länger ausgesetzt ist¹²¹. In der Literatur konnten zahlreiche Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Kolonkarzinomen sowie fett- und kohlenhydratreicher Diät aufgezeigt werden¹²²⁻¹²⁵.

2.3 Bedeutung von Gallensäuren als Signal- und Modulatormoleküle

In zahlreichen Studien konnten Veränderungen in der physiologischen und pathophysiologischen Zusammensetzung des Gallensäuren-pools mit der Entstehung degenerativer Darmerkrankungen, Cholestase, Gallensteine, Darmkrebs, Typ-2 Diabetes mellitus und Fettleber in Korrelation gebracht werden^{8-10,91,126}. Um das fragile Gleichgewicht zwischen positiver und negativer Wirkung der Gallensäuren aufrechtzuerhalten, bedarf es eines komplexen Regulationsmechanismus der sowohl die Synthese, Exkretion und Reabsorption kontrolliert. Hierbei spielen die nukleären Transkriptionsfaktoren FXR (*Farnesoid X Receptor*) und LXR (*Liver X Receptor*), sowie der TGR5 (*G Protein-Coupled Bile Acid Receptor*) eine Schlüsselrolle. Durch die Induktion dieser Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren kontrollieren die Gallensäuren nicht nur ihre eigene Biosynthese, ferner spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Fett-, Glucose- und Energiemetabolismus^{127,128}.

Beim **FXR** handelt es sich um einen Gallensäure-induzierten Transkriptionsfaktor, der ausschließlich in Geweben exprimiert wird, die Gallensäuren im enterohepatischen Kreislauf ausgesetzt sind wie z.B. Leber, Gallenblase, Niere, Darm und Fettgewebe^{129,130}. Im Gallensäuremetabolismus stellt FXR einen wichtigen Regulator der Gallensäuresynthese dar, wobei erhöhte Konzentrationen an Gallensäuren die eigene *de novo*-Synthese über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmen. Dieser Regulationsmechanismus ist von immenser physiologischer Bedeutung, da hierdurch die Akkumulation von zelltoxischen Gallensäuren in den Hepatozyten der Leber verhindert wird^{92,131}.

Die molekulare Grundlage für die Regulation der Gallensäurebiosynthese basiert hierbei primär auf der Hemmung der *CYP7A1*- und *CYP8B1*-Expression¹³². Die Hydroxylierung durch das Enzym Cholesterol-7 α -hydroxylase (*CYP7A1*) stellt den initiierten und zugleich geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese von Gallensäuren aus Cholesterol über den klassischen (neutralen) Reaktionsweg dar. Wird das Zwischenprodukt durch *CYP8B1* (Sterol 12 α -hydroxylase) hydroxyliert, entsteht CA, im anderen Falle CDCA (siehe 2.1, Abbildung B-1).

Da FXR selber nicht in der Lage ist nach der Aktivierung an den *CYP7A1*- bzw. *CYP8B1*-Promotor zu binden, wird die Reduktion der Expression von *CYP7A1* und *CYP8B1* über einen SHP- (*Small Heterodimer Partner*) modulierten molekularen Mechanismus initiiert¹³³. FXR heterodimerisiert hierbei zunächst obligat mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, dem *Retinoid X Receptor* (RXR)¹³⁴. Erst dieser FXR-RXR-Komplex besitzt eine geringe transkriptionelle Aktivität, die durch die Bindung verschiedener Liganden gesteigert werden kann. Im Falle eines gesteigerten physiologischen Gallensäurespiegels bindet das aktivierte FXR-RXR-Heterodimers an das *FXR-response Element* (FXRE) im Promotor des *SHP*-Gens, wodurch die Expression von *SHP* induziert wird¹³⁵. *SHP*-Proteine bilden zusammen mit dem LRH-1 (*Liver Receptor Homolog-1*) einen Komplex, welches die Expression von *CYP7A1* und *CYP8B1* inhibiert¹³⁶. Auf diese Weise hemmen Gallensäuren bei abnormalen hepatischen Konzentrationen ihre eigene Syntheserate.

Mäuse mit einer genetischen *CYP7A1*-Defizienz leiden aufgrund eines verringerten Gallensäurepools an Malabsorption von Fetten und Vitaminen¹³⁷. Beim Menschen konnte ein Mangel an *CYP7A1* mit erhöhten Cholesterolkonzentrationen in der Leber, einer verminderten Anzahl an LDL- (*Low-Density Lipoprotein*) Rezeptoren sowie der Entwicklung von Hypercholesterolämie in Verbindung gebracht werden^{138,139}.

Weiterhin wird FXR bereits im terminalen Ileum exprimiert, wo es bereits über die Bildung des endokrinen Hormons *Fibroblast Growth Factor 15* (FGF15, bei Nagern) bzw. des humanen FGF19 in die Gallensäuresynthese sowie -transport regulativ eingreifen kann, wobei vermutlich über die Interaktion mit dem *FGF Receptor 4* (FGFR4) der Hepatozyten eine über SHP-vermittelte Reduktion der *CYP7A1*-Expression erfolgt^{129,140}. Als transkriptioneller Aktivator reguliert der FXR darüber hinaus die Expression der am enterohepatischen Kreislauf beteiligten Gallensäuretransportproteine (u.a. ASBT) und stimuliert die Konjugation der freien Gallensäuren durch die Aktivierung von *BAAT*^{141,142} (siehe Abbildung C-3).

Neben der Kontrolle der Synthese und des enterohepatischen Transports von Gallensäuren ist der FXR auch am anderen physiologischen Stoffwechselwegen beteiligt. So reguliert FXR indirekt über die SHP-Proteine die Expression von *SRBP1C* (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*). *SREBP1C* wirkt als Hauptregulator der Fettsäure-, Triacylglycerol- und Lipoproteinsynthese und stimuliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die in den Lipidmetabolismus eingebunden sind, wie die Fettsäuresynthase (FAS) und die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC)⁷. Aus diesem Grund korreliert eine FXR-Aktivierung mit der Herabsetzung des Triacylglycerol-Niveaus im Plasma¹⁴³. Beim Krankheitsbild der nicht-alkoholischen Fettleber (NAFLD, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) kommt es zur Akkumulation von Fett und Fettvakuolen in die Hepatozyten. NAFLD zählt zu den häufigsten Lebererkrankungen weltweit und tritt häufig im Verbund mit metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Adipositas auf¹⁴⁴. Werden die Lipide als Triacylglycerole im Zytoplasma gespeichert, bildet sich eine ballonartige Zelldegeneration (*Ballooning*) aus.

Lassen sich neben Fettablagerungen auch Entzündungsmarker identifizieren, handelt es sich um eine Steatohepatitis (NASH, *Non-Alcoholic Steatohepatitis*). Als Ursache wird das Ungleichgewicht zwischen dem hepatischen Zufluss freier Fettsäuren und der Synthese und Exkretion von Triacylglycerolen angesehen, sodass bei einem Überangebot an Triacylglycerolen, diese in Form von Fetttröpfchen in das Zytoplasma der Hepatozyten eingelagert werden¹⁴⁵. Über die oben beschriebene Einflussnahme von FXR auf den Lipidstoffwechsel kann eine FXR-Aktivierung Einfluss auf die Pathogenese der NAFLD/NASH nehmen¹⁴⁶.

Der Einfluss vom FXR auf den Glukosestoffwechsel wurde in einer Studie von LEFEBVRE et al. (2009) aufgezeigt¹³³. Einen positiven Einfluss auf die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität bei Mäusen konnte durch eine FXR-Aktivierung bei Mäusen mit Typ-2 Diabetes mellitus festgestellt werden. Entsprechend bewirkte ein *Knockout* der FXR-Expression eine Steigerung der Hyperglykämie und Dyslipidämie. Weiterhin konnte in einem Experiment mit *CYP8B1*^{-/-}-Mäusen die Bedeutung einer *CYP8B1*-Inhibierung auf die Regulation des Glukosestoffwechsels aufgezeigt werden. Ein *CYP8B1*-Defizienz resultierte in einer gesteigerten Glukosetoleranz und Insulinsensitivität¹⁴⁷.

Diese Erkenntnisse spielen eine Rolle bei der Untersuchung und Entwicklung von FXR-Agonisten. Die primären Gallensäuren CDCA, sowohl in freier als auch konjugierter Form weist die höchste Affinität auf¹⁴⁸. Weitere Agonisten stellen DCA, LCA und CA dar¹⁴⁹. Im Gegensatz dazu repräsentieren die Muricholsäuren und ihre Taurin-Konjugate (v.a. T- α -MCA und T- β -MCA) wirksame Antagonisten⁹⁴. Neben den natürlichen Agonisten kommen bei der Therapie von metabolischen Erkrankungen wie beispielsweise cholestatischen Lebern, Diabetes, NAFLD und primärer biliärer Zirrhose synthetische FXR-Liganden z.B. GW4064 26 und 6-ECDCA (6-Ethyl-CDCA) zum Einsatz^{150,151}.

Neben den genannten FXR-induzierten Effekten von Gallensäuren, sind diese Moleküle ebenfalls natürliche Liganden des **LXR**. Dieser kommt in zwei Isoformen – LXR α und LXR β – vor und wird vorwiegend in der Leber und weiteren metabolisch aktiven Geweben exprimiert¹⁵². In gleicher Weise wie der FXR ist der LXR an der Regulation der Cholesterolumöostase beteiligt. Bei einem erhöhten Cholesterolangebot wird die vermehrte Expression der Cholesterol-7 α -Hydroxylase (*CYP7A1*), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Gallensäuresynthese, durch den Transkriptionsfaktor LXR α vermittelt. Komplementär zum FXR bildet LXR mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, dem RXR ein obligates Heterodimer, welcher an eine definierte Nukleotidsequenz, dem sogenannten *LXR-Response Element* (LXRE) im Promotor des *CYP7A1*-Gens bindet und so seine Expression ermöglicht¹⁵³ (siehe Abbildung B-3).

Neben der Rolle als transkriptioneller Aktivator in der Regulation des Gallensäuren- und Cholesterolmetabolismus, ist LXR am Lipoprotein-, Triacylglycerol- und Glukosestoffwechsel beteiligt^{154,155}. Die größte Aktivitätssteigerung erfolgt durch Oxysterole. In Abhängigkeit der zellulären Konzentration an Cholesterol und Oxysterolen induziert LXR die Expression von Transportproteinen, die für den biliären Cholesterol-Efflux und die intestinale Absorption verantwortlich sind¹⁵⁶.

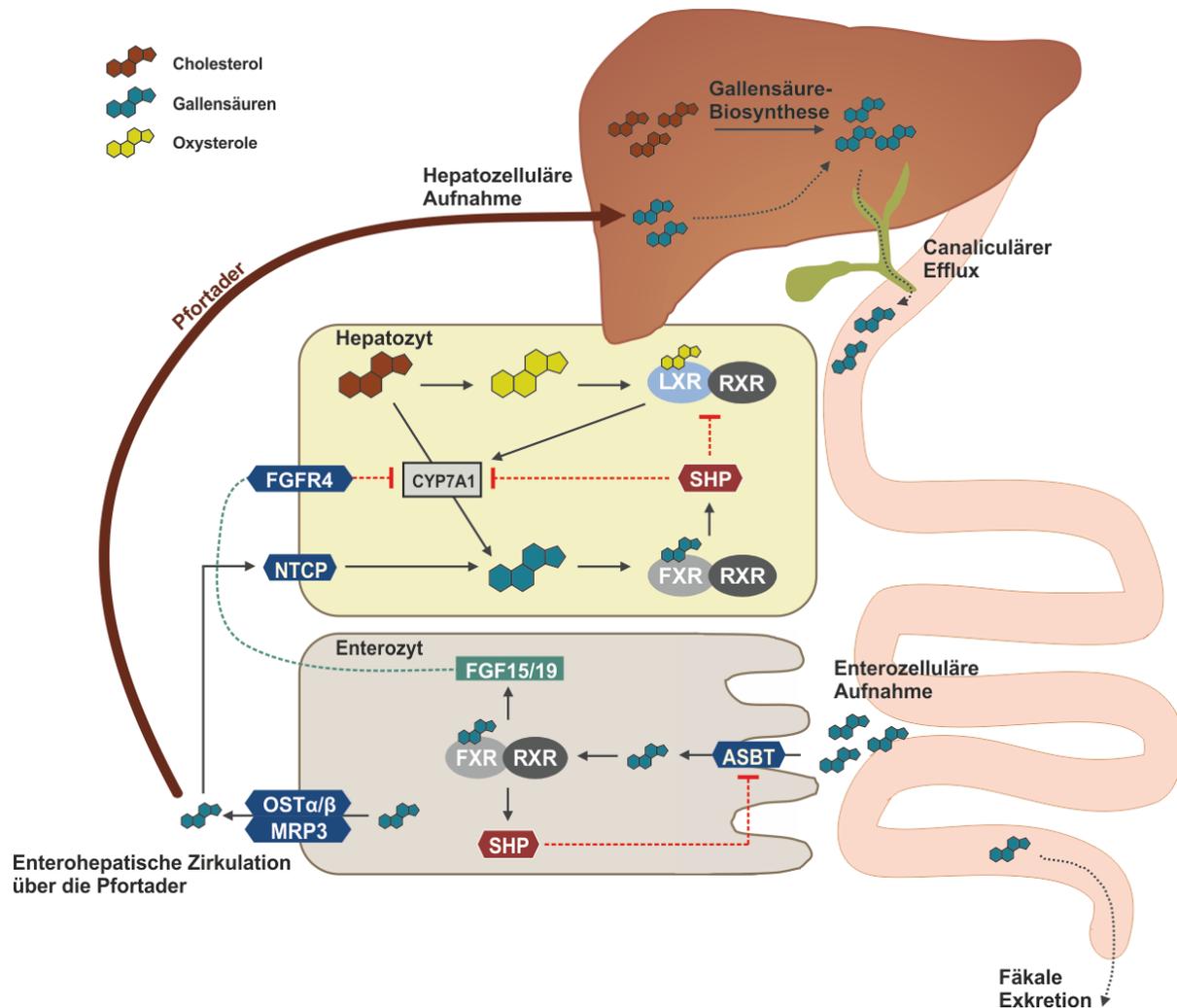


ABBILDUNG B-3 Regulation der Gallensäurebiosynthese durch die nukleären Rezeptoren FXR und LXR.

Hohe Konzentrationen an Gallensäuren aktivieren den Kernrezeptor FXR, welcher als Heterodimer mit RXR seine Wirkung als Transkriptionsfaktor entfaltet, wodurch die Expression von SHP induziert wird. Dieses hat eine hemmende Wirkung auf das Schlüsselenzym der Gallensäurebiosynthese CYP7A1 und auf NTCP, ein Protein welches an der Gallensäureaufnahme in der Leber beteiligt ist. Die Expression von CYP7A1 wird bereits über die Aktivierung von FXR im Ileum und der daraus gesteigerten Produktion des Hormons FGF15/19, welches durch Interaktion mit FGFR4 in der Leber, die Transkription des CYP7A1-Gens hemmt, induziert.

Hohe Konzentrationen an SHP vermindern darüber hinaus die Aktivität des LXR. Die daraus resultierende gehemmte Transkription des CYP7A1-Gens zieht eine Erhöhung des Cholesterolspiegels durch eine verminderte Gallensäurebiosynthese nach sich. LXR: *Liver X Receptor*, RXR: *Retinoid X Receptor*, SHP: *Small Heterodimer Partner*, FXR: *Farnesoid X Receptor*, CYP7A1: *Cholesterol-7 α -hydroxylase*, FGFR4: *Fibroblast Growth Factor Receptor 4*, NTCP: *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Pump*, FGF15/19: *Fibroblast Growth Factor 15/19*, ASBT: *Apical Sodium-Dependent BA Transporter*, OST α / β : *Organic Solute Transporter α / β* , MRP3: *Multiple Resistance Protein 3* (eigene Darstellung, in Anlehnung an KUIPERS et al. (2014)¹⁵⁷)

Der Einfluss der Gallensäuren auf den Energiehaushalt erfolgt über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor **TGR5**. Der Rezeptor wird durch freie und konjugierte Gallensäuren aktiviert. Die potentesten Agonisten repräsentieren LCA und DCA, gefolgt von CDCA und CA^{158,159}. Die Signalkaskade, die durch eine Gallensäurenaktivierung des TGR5 ausgelöst wird, resultiert in einer cAMP- (cyclisches Adenosinmonophosphat) vermittelten Aktivierung der *Type 2 Deiodinase* (DIO2), wodurch die Umwandlung des inaktiven Schilddrüsenhormons Thyroxin in das aktive 3,5,3'-Triiodothyronin im braunem Fettgewebe (BAT, *Brown Adipose Tissue*) induziert wird¹⁶⁰.

Eine Aktivierung von TGR5 bedingt nachweislich anti-inflammatorische und anti-atherosklerotische Effekte, eine Optimierung der Glukosetoleranz und der Insulinsensitivität sowie eine Steigerung des Energieumsatzes¹⁵⁸. Der Zusatz der TGR5-Agonisten CA oder CDCA zu einer fettreichen Diät verhinderte in C57BL/6J-Mäusen die Entstehung von ernährungsbedingtem Übergewicht, da der Energieumsatz im BAT gesteigert wurde¹⁶⁰. Des Weiteren geht eine TGR5-Aktivierung mit einer verminderten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen einher. Eine Aktivierung von TGR5 führt daneben zur Freisetzung von *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1), welches Blutzuckerspiegel senkende Eigenschaften aufweist^{38,161}. Die Expression von TGR5 findet in vielen Geweben statt. Im Intestinaltrakt, ist der TGR5-Rezeptor hauptsächlich auf das Ileum und den Kolon beschränkt¹⁶². Weiterhin erfolgt eine Expression in der Gallenblase, Milz, in der Skelettmuskulatur sowie im braunen und weißen Fettgewebe^{162,163}.

2.4 Intestinale Modifikation durch bakterielle Prozesse

Gallensäuren werden aktiv im distalen Ileum in das intestinale Lumen ausgeschieden. Bis zum terminalen Ileum werden ca. 95% der Gallensäuren über passive und aktive Mechanismen rückresorbiert und im enterohepatischen Kreislauf via der Pfortader zur Leber transportiert, teilweise rekonjugiert und mit der Gallenflüssigkeit erneut in das Intestinum sekretiert. Nur ein geringer Anteil von ca. 5% gelangt ins Kolon und wird durch mikrobielle Prozesse wie Dekonjugation, Dehydroxylierung, Oxidation der am C-3, C-7 und C-12 lokalisierten Hydroxylgruppen, Epimerisierung, Veresterung und Desulfatierung umgewandelt^{77,164}. Die Metabolisierung der Gallensäuren durch die intestinale Mikrobiota ist ein hochkomplexer Prozess, wodurch eine Vielzahl verschiedenster Moleküle mit unterschiedlichen biologischen und physiochemischen Eigenschaften gebildet wird.

Tabelle B-1 Bakteriengattungen der Darmmikrobiota, die am Gallensäurenstoffwechsel beteiligt sind.¹⁶⁴

	Bakteriengattung
Dekonjugation	<i>Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Lactobacillus, Listeria</i>
Oxidation und Epimerisierung	<i>Bacteroides, Clostridium, Escherichia, Eggerthella, Eubacterium, Peptostreptococcus, Ruminococcus</i>
7 α -Dehydroxylierung	<i>Clostridium, Eubacterium</i>

Der erste Schritt in der bakteriellen Transformation von Gallensäuren stellt die Spaltung der Peptidbindung unter Bildung freier, unkonjugierter Gallensäuren dar, welcher durch das Enzym **Gallensalzhydrolase (BSH, Bile Salt Hydrolase)** katalysiert wird. Durch die bakterielle Deamidierung wird die Hydrophobizität der entstehenden Moleküle erhöht und damit die Wahrscheinlichkeit, in den enterohepatischen Kreislauf resorbiert zu werden, gemindert. Weiterhin können erst nach einer Dekonjugation die Folgereaktion wie 7-Dehydroxylierung bzw. Dehydrogenierung stattfinden, bedingt durch stereochemische Behinderungen auf Grund der Größe der Seitenkette von konjugierten Gallensäuren¹⁶⁵. Die Aktivität von BSH-Enzyme wurde in *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium* und *Bacteroides* identifiziert¹⁶⁶.

Der Vorteil einer BSH-Aktivität für Bakterien ist noch nicht vollständig geklärt. RIDLON et al. (2006) vermuten, dass diese Reaktionen für Bakterien eine Möglichkeit darstellt, um zellschädliche konjugierte Gallensäuren in ihrer Mikro-Umgebung abzubauen⁷⁷. Diese These ist allerdings umstritten, da die Mehrheit der freien Gallensäuren ein höheres toxisches Potential aufweist. Weiterhin stehen die Reaktionsprodukte der BSH-katalysierten Reaktion, als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Ressource den Bakterien als Nahrungsquelle zur Verfügung¹⁶⁷.

Auch der Einfluss einer mikrobiellen BSH-Aktivität auf den Wirtsorganismus ist vielfältig. Es wird angenommen, dass die Verringerung der Cholesterolkonzentration im Serum mit der Aktivität bakterieller BSHs in Verbindung stehen könnte. Dekonjugierte, freie Gallensäuren werden mit einer geringeren Effektivität als ihre konjugierten Partner reabsorbiert, wodurch die fäkale Exkretion gesteigert wird. Daneben zeigen diese eine geringe Neigung zur Solubilisierung von diätetischen Lipiden. Die Senkung des Cholesterolslevels im Serum resultiert daher aus dem Zusammenwirken einer gesteigerten *de novo*-Synthese, um die Konzentration an Gallensäuren im zirkulierenden Gallensäurenpool aufrechtzuerhalten und aus einer verminderten Cholesterolabsorption im intestinalen Lumen, da die Solubilisierung durch freie Gallensäuren vermindert ist¹⁶⁶. Aus diesem Grund könnte die mikrobielle BSH-Aktivität aber auch die Aufnahme von Nahrungslipiden und fettlöslichen Vitaminen negativ beeinflussen¹⁶⁸. Diese Hypothese schließt allerdings negative Einflüsse der sekundären Gallensäuren nicht aus.

Die Löslichkeit von Cholesterol in der Gallenflüssigkeit hängt maßgeblich vom Lösungsgleichgewicht zwischen Gallensäuren und den unpolaren Bestandteilen (v.a. Cholesterol) ab. Konzentrationsveränderungen des Gallensäurenpools können das fragile Gleichgewicht hin zu einer hydrophoberen, Cholesterol-gesättigten Galle verschieben¹⁶⁹. Weiterhin kann eine übermäßige Gallensäuredekonjugation beim Menschen zu negativen Wirkungen wie Steatorrhoe und Bildung zytotoxischer sekundärer Gallensäuren führen¹⁷⁰.

Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) spielen eine Rolle bei der Übertragung von zwei Reduktionsäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen, wobei in Abhängigkeit vom Redoxpotenzial der Umgebung entweder die Reduktion oder die Oxidation von Hydroxyl- bzw. Ketogruppen an Position C-3, C-7 und C-12 des Sterannukleus katalysiert wird¹⁷¹. Die Reaktion erfolgt unter Bildung eines stabilen Oxo-Intermediats; die Keto-Gruppen können wiederum in stereospezifische α - bzw. β -Hydroxylgruppen umgewandelt werden^{172,173}. Eine Epimerisierung erfordert die Aktivität von zwei stereochemischen unterschiedlichen HSDHs und kann sowohl durch eine Spezies, die über eine α - als auch β -HSDH-Aktivität verfügt, oder durch zwei unterschiedliche Bakterien, von denen eins eine α -HSDH und das andere eine β -HSDH bildet, katalysiert werden.

Nach heutigem Kenntnisstand sind 12 Oxogallensäuren bekannt, die in sehr geringen Konzentrationen in der menschlichen Fäzes vorkommen¹⁶⁴. Die Oxidation von 3 α / β -Hydroxylgruppen, sowie die Reduktion von 3-Oxogruppen am Steroidgrundgerüst, werden von der 3 α - bzw. 3 β -HSDH, katalysiert, wobei NADH bzw. NADPH als Kofaktoren dienen. Die 3 α / β -HSDH werden entweder nach Induktion mittels primären Gallensäuren oder konstitutiv, d.h. dauerhaft gleichmäßig, expriert. Die 3 α -HSDH wurde bei den intestinalen Bakterien *Peptostreptococcus productus* und *Egg. lenta* gefunden. Allgemein weisen sie eine höhere Affinität für tri- gegenüber di-hydroxy-Gallensäuren auf⁷⁷.

Die Oxidation beziehungsweise Reduktion an Position C-7 des Sterannukleus werden von 7 α - bzw. 7 β -HSDH katalysiert. Sie sind weitverbreitet in der Gattung *Bacteroides*, *Escherichia*, *Eubacterium* und *Clostridium*. Die 7 α / β -HSDH zeigen im Vergleich zur 3 α / β -HSDH eine größere Affinität gegenüber di-hydroxy-Gallensäuren auf⁷⁷. 12 α -HSDH oxidiert reversibel α -Hydroxylgruppen am C-12 des Steran-Grundgerüsts. In der Literatur werden sowohl NADPH (*Clostridium*) als auch NADH⁺-abhängige (*Egg. lenta*) Vertreter beschrieben⁷⁷.

Die Stereochemie der Hydroxylgruppen hat einen wesentlichen Einfluss auf die chemischen und physiologischen Eigenschaften der Gallensäuren. Durch die Epimerisierung der 7 α -Hydroxylgruppe in die β -Konfiguration wird aus CDCA die als Arzneimittel eingesetzte Gallensäure UDCA gebildet (vgl. Abbildung B-4). Der Konfigurationswechsel hat eine Erhöhung der Hydrophilie und damit eine Abnahme der Toxizität zur Folge¹⁷⁴. Daher kann davon ausgegangen werden, dass HSDH einen Schutzfaktor der intestinalen Bakterien vor toxischen Gallensalzen darstellt, indem die Konzentration der hydrophoben Spezies gesenkt wird. Unterstützt wird die These durch die Tatsache, dass HSDH eine höhere Affinität gegenüber Dihydroxy- im Vergleich zu Trihydroxygallensäuren aufweist⁷⁷. Weiterhin werden die gebildeten Reduktionsäquivalente von den Bakterien in der anabolen Biosynthese und oxidativen Phosphorylierung zur Energiegewinnung verwertet¹⁷⁵.

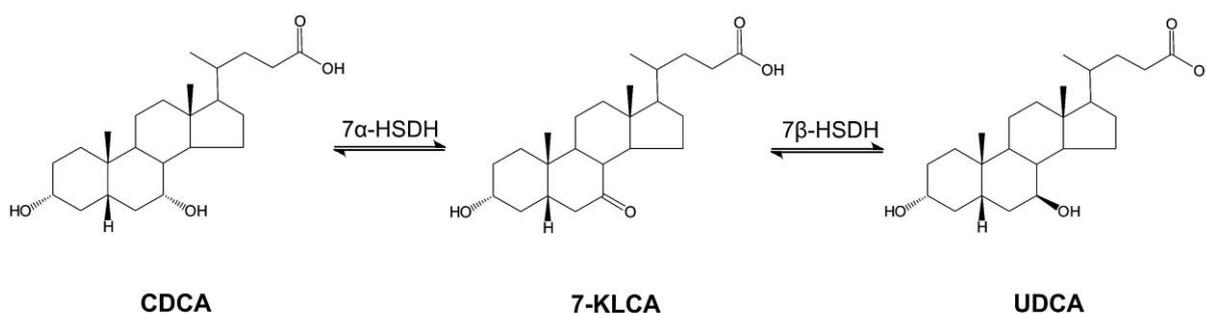


ABBILDUNG B-4 Reaktionsschema einer HSDH-katalysierten Reaktion. Die Umwandlung von CDCA in UDCA verläuft über das Oxo-Intermediat 7-KLCA (7-Ketolithocholsäure) durch die Aktivität einer 7 α -HSDH. Die Umkehrreaktion wird durch die 7 β -HSDH katalysiert.

Die **7-Dehydroxylierung** der primären Gallensäuren (CA und CDCA) ist die quantitativ wichtigste und zudem die physiologisch bedeutungsvollste bakterielle Gallensäuretransformation im Kolon des Menschen. Der Reaktionsweg einer 7 α / β -Dehydroxylierung besteht aus einer Abfolge mehrerer oxidativer und reduktiver Schritte, welche in der Bildung der sekundären Gallensäuren DCA und LCA resultiert.

Das sekundäre, hydrophobe Gallensalz wird anschließend aus der Bakterienzelle transportiert und dient vermutlich dazu, dem Bakterium einen Selektionsvorteil gegenüber sensitiveren Bakterien zu verschaffen⁷⁷. Die bisher bekannten Bakteriengattungen, die eine 7 α -Dehydroxylase-Aktivität aufweisen, sind *Clostridium* und *Eubacterium*¹⁶⁴.

3 Gallensäureanalytik – ein Überblick

Aufgrund der multifunktionalen Rolle der Gallensäuren bei der Regulation verschiedener Stoffwechselwege (v.a. Energie-, Lipid- und Glucosehomöostase), kann die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Gallensäuren-pools als Indikator für die Feststellung des ernährungsphysiologischen und pathologischen Zustands herangezogen werden. In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Vielzahl verschiedener Techniken für die qualitative und quantitative Bestimmung von Gallensäurenmetaboliten beschrieben. Die komplexe Zusammensetzung des Gallensäurenspektrums bestehend aus einer Vielzahl biologisch aktiver und inaktiver Moleküle, das Vorkommen dieser Biomoleküle bei relativ niedrigen Konzentrationen, sowie stark variierende Polaritätsunterschiede zwischen individuellen Vertretern und die Präsenz von Stellungsisomeren stellen hohe Anforderungen an die eingesetzte analytische Messmethode dar¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

Anerkannte Verfahren für die Analyse von Gallensäuren in biologischen Matrices umfassen vordergründig die klassischen Chromatographietechniken (TLC, GC & HPLC), aber auch enzymatische, immunologische und elektrochemische Verfahren wurden beschrieben. Die letztgenannte Methode weist deutliche Nachteile bezüglich der Spezifität und Reproduzierbarkeit auf¹⁷⁹.

Enzymatische Verfahren zur Bestimmung der Gesamtgallensäurenkonzentration (TBA, *Total Bile Acid Concentration*) unter Verwendung von Hydroxysteroiddehydrogenasen (v.a. 3 α -, 7 α - & 12 α -HSDH) eignen sich aufgrund ihrer Schnelligkeit und Einfachheit besonders für Direktuntersuchung von unbehandelten physiologischen Flüssigkeiten (Serum, Urin) und werden heute noch in der Routineanalytik sowie in der medizinischen Diagnostik eingesetzt¹⁸⁰⁻¹⁸². Allerdings kann hierbei weder eine Unterscheidung zwischen einzelnen Gallensäuren noch eine Aussage über den Konjugationszustand getroffen werden. Darüber hinaus leidet das Verfahren im Allgemeinen unter schlechter Empfindlichkeit und unerwünschten Interferenzen, die durch Matrixbestandteile hervorgerufen werden¹⁸³. Verringerte Nachweisgrenzen und eine hohe Spezifität werden durch Radio- und Enzymimmunoassays erreicht, doch stellen auch hier Kreuzreaktionen durch strukturelle Gallensäurenanaloga ein großes Defizit dar. Allerdings können mit Hilfe der immunologischen Techniken die unkonjugierten Gallensäuren, welche einen eminenten Anteil am Gallensäuren-pool ausmachen, aufgrund der Antikörperspezifität gegenüber Glycin- und Taurinkonjugaten meist nicht detektiert werden¹⁷⁷.

Um ein qualitative und quantitatives Gallensäurenprofil zu generieren, bedient sich die Mehrheit der Analysenmethoden chromatographischer Trenntechniken wie der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC, *High Performance Thin Layer Chromatography*), der Gaschromatographie (GC) und der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). In früheren Studien wurden eine Trennung von Gallensäuren auf Normalphasen wie Silica oder Aluminiumoxid durchgeführt. Präparativ eignet sich diese Methode, um Gallensäuren in ihre freien und konjugierten Formen zu unterteilen^{184,185}.

In Kombination mit der HPTLC konnte eine halbquantitative Auswertung vorgenommen werden. Eine geringe Selektivität und eine hohe Nachweisgrenze zeigen jedoch die Insuffizienz dieser Trenntechnik auf¹⁷⁸.

GC-Applikationen sind aufgrund der hohen Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit weit verbreitet in der Gallensäureanalytik^{186,187}. Allerdings setzt die Verwendung dieser Messtechnik eine Reihe von aufwendigen Probenvorbereitungsschritten voraus, einschließlich der Isolierung, Hydrolyse und Derivatisierung der Analyten, wodurch die analytische Performance gemindert wird¹⁸⁸. Die Kopplung mit der Massenspektrometrie erlaubt die Identifizierung unbekannter Moleküle sowie die Erhöhung der Spezifität speziell im Hinblick auf die Differenzierung von isobaren Verbindungen in komplexen Matrices (z.B. Fäzes). Durch den Einsatz der Elektronenstoßionisation (EI) und weiterer Fragmentierungstechniken können umfangreiche Strukturinformationen erhalten werden. Die große Anzahl an publizierten Referenzspektren erleichtert die Identifikation der Substanzen¹⁷⁷. Die kürzere Analysendauer und die höhere Auflösung repräsentieren den wesentlichen Vorteil im Vergleich zu HPLC-Applikationen, allerdings stellt die komplexe Probenaufarbeitung den limitierenden Schritt, besonders in Hinblick auf den Einsatz in der Routineanalytik, dar.

Die GC-Anforderung für die Volatilität wurde durch die Einführung der HPLC eliminiert. Der Hauptnachteil der HPLC war lange Zeit das Unvermögen die Zielsubstanzen, in erster Linie die unkonjugierten Gallensäuren, zu detektieren. Mittels UV-Detektoren können nur amidierete Gallensalze nachgewiesen werden. Allerdings werden durch Wellenlängen im kurzwelligen UV-Bereich (~ 200 nm) auch viele Bestandteile des Laufmittels und Probenmatrix mit erfasst. Um die Sensitivität zu steigern sind Vor- und Nachsäulenderivatisierungsverfahren beschrieben worden, um die Moleküle in einen UV- oder fluoreszenzaktiven Zustand zu überführen^{176,178}. Hierbei wird bei Methoden, welche sich der Fluoreszenzdetektion bedienen, die höchste Sensitivität erreicht¹⁸⁹. Die Detektion mittels Brechungsindexdetektor spielt auf Grund der geringen Selektivität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit nur eine marginale Rolle in der Analytik. Eine weitere Detektionstechnik, die im Zusammenhang mit der Analytik von Gallensäuren Anwendung findet, ist der ELSD (*Evaporative Light Scattering Detector*)¹⁹⁰⁻¹⁹².

Die Probleme in der Detektorempfindlichkeit und der Spezifität wurden durch die Verwendung von Massenspektrometern als Detektoren in der Flüssigkeitschromatographie (LC, *Liquid Chromatography*) deutlich reduziert werden¹⁷⁷. Nach der Einführung von LC-MS-Applikationen zur Bestimmung von freien und konjugierten Gallensäuren in biologischen Matrices wie Plasma, Fettgewebe und Fäzes mit hoher Spezifität und Sensitivität, hat sich die Bedeutung von GC-MS insbesondere bei Routineanwendungen verringert¹⁹³⁻¹⁹⁵. Dennoch weisen viele Methoden analytische Defizite, aufgrund von aufwendigen Probenvorbereitungsverfahren, geringer Spezifität durch die Verwendung vom SIM-Modus (*Selected Ion Monitoring*) oder der Koelution von isobaren Gallensäuren, auf¹⁷⁷.

Teil C – Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die große Bedeutung der Gallensäuren als Regulatoren verschiedenster Stoffwechselwege konnte vielfach demonstriert werden. Neben der Entwicklung degenerativer Darmerkrankungen, werden Störungen der Gallensäurehomöostase mit der Entstehung des metabolischen Syndroms, chronischen Darmentzündungen, Gallensteinen sowie Kolonkarzinomen in Korrelation gebracht. Die Bioverfügbarkeit der Gallensäuren wird dabei maßgeblich durch die Aktivität der intestinalen Mikrobiota bestimmt, wodurch ein komplexes, individuelles Spektrum an biochemisch aktiven bzw. inaktiven Metaboliten resultiert.

Voraussetzung für die Untersuchung des Gallensäureprofils ist daher die Existenz einer verlässlichen Analysemethoden, die es ermöglicht, möglichst viele stoffwechselrelevante freie und konjugierte Gallensäuren quantitativ zu erfassen. Aus diesem Grund lag der **erste Schwerpunkt** dieser Dissertation in der Entwicklung einer sensitiven Quantifizierungsmethode für die Untersuchung des Gallensäuremetabolismus *in vitro* und *in vivo*.

Die vielfältigen physikochemischen Eigenschaften, bei gleichzeitig wenig chemisch-strukturellen Unterschieden zwischen individuellen Gallensäuren sowie ihr Vorkommen im niedrigen Konzentrationsbereich, stellen die generelle Herausforderung an die Analytik dar. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von analytischen Methoden zur Quantifizierung von Gallensäuren auf Basis der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) beschrieben.

Allerdings zeigt die Mehrheit der Methoden Nachteile hinsichtlich der Spezifität, chromatographische Koelution einzelner Analyten sowie einem hohen Zeitaufwand bedingt durch aufwendige Probenvorbereitungsverfahren. Auf die einzelnen Punkte soll im Folgenden näher eingegangen werden:

- **Spezifität:** Die Eigenschaft, dass vor allem freie Gallensäuren im Fragmentierungsprozess nur ein schwaches Vermögen zur Fragmentbildung zeigen, wurde vielfach beschrieben. Dies führte in der Vergangenheit oft dazu, dass die Vorläufer-Ionen selbst als Fragment-Ionen selektiert wurden. Gerade bei der Untersuchung der Analyten in komplexen Matrices ist dieser Messmodus durch eine geringe Spezifität und Empfindlichkeit limitiert.
 - ⇒ Aus diesem Grund soll bei der Entwicklung des massenspektrometrischen Systems der MRM-Modus (*Multiple Reaction Monitoring*) Anwendung finden.
- **Flüssigkeitschromatographische Trennung:** Die Mehrzahl der Gallensäuren stellen Strukturanaloga dar, die sich ausschließlich in der Stellung und Konfiguration der Hydroxylgruppen am Sterankörper unterscheiden. Dadurch können keine selektiven Massenübergänge ermittelt werden. Eine chromatographische Basislinientrennung ist damit eine unumgängliche Voraussetzung, um eine selektive und individuelle Quantifizierung einzelner Gallensäurenvertreter zu gewährleisten, was in der Vergangenheit oft nicht erreicht wurde.
 - ⇒ Durch die Variation verschiedener chromatographischer Bedingungen wie der Wahl der stationären Phase, Laufmittelzusammensetzung, pH-Wert des Gradienten sowie Gradientenverlauf soll eine chromatographische Separierung aller untersuchten Gallensäuren erzielt werden.

- **Probenvorbereitung:** Um den Einsatz der LC-MS-basierten Messmethode in Studien mit großem Probenumfang zu ermöglichen, soll das Augenmerk bei der Entwicklung des Probenaufbereitungsverfahrens auf die Schnelligkeit und Einfachheit der Methode gelegt werden, ohne dabei die analytische *Performance* hinsichtlich der Wiederfindung, des chromatographischen Verhaltens (Auflösung, Trennleistung) sowie Suppressionseffekte in der Ionenquelle zu vernachlässigen.
 - ⇒ Hierfür sollen bereits publizierte Festphasenextraktionsverfahren (SPE, *Solid Phase Extraction*) getestet und mit Resultaten aus einem Extraktionsversuch mit organischen Lösungsmitteln verglichen werden.

Auf Grund des Vorkommens von Gallensäuren in vielen stoffwechselaktiven Geweben, soll die Analysenmethode mit hoher Sensitivität und Präzision anwendbar für eine Vielzahl von biologischen Matrices wie Blutplasma, Darminhalt und Fettgewebe sein.

Im Anschluss an die Methodenentwicklung soll eine Validierung der entwickelten Messmethode nach den anerkannten wissenschaftlichen Maßstäben erfolgen, um die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit zu demonstrieren.

Der **zweite Fokus** dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Anwendbarkeit der Analysenmethode zur Untersuchung des Metabolismus von Gallensäuren.

Das Ziel soll es sein, den Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf den physiologischen Gallensäure- und Lipidstoffwechsel *in vivo* zu bewerten. Hierfür soll zunächst, das Vermögen von vier ausgewählten *Coriobacteriaceae*-Stämmen Einfluss auf die Biotransformation von Gallensäuren zu nehmen, in einem *in vitro*-Fermentationsmodell charakterisiert werden. Da in einfachen *in vitro*-Testsystemen systemische Einflüsse des Organismus unberücksichtigt bleiben, soll nachfolgend die Durchführung einer Tierstudie mit gnotobiotischen Mäusen, die mit Bakterien aus dem *Coriobacteriaceae*-Konsortium kolonisiert werden, erfolgen.

Ausgehend vom Vergleich der Metabolitkonzentration zwischen den kolonisierten Mäusen und den Kontrollgruppen (keimfreie und spezifisch pathogenfreie-Mäuse) in differierenden Geweben, ist es von immenser Bedeutung, Unterschiede im Gallensäureprofil herauszustellen, um den Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf den Gallensäurestoffwechsel herausarbeiten sowie neue Hypothesen zur Entstehung von Krankheiten aufzustellen zu können. Die Auswertung mittels multivariater statistischer Datenanalyse soll es dabei ermöglichen, Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Gruppen und Einflussfaktoren aufzuzeigen.

Teil D – Ergebnisse und Diskussion

1 Analytik von Gallensäuren

1.1 Entwicklung der LC-ESI-MS/MS-Methode

In den vergangenen Jahren hat sich die Kombination aus Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) zu einem Standardanalyseverfahren mit breiter Akzeptanz etabliert. Insbesondere in der klinischen Chemie hat sich die LC-MS/MS für das Screening und den quantitativen Nachweis zahlreicher Stoffwechselprodukte als zuverlässige Messtechnik erwiesen. Dank verschiedenster Ionisierungstechniken kann die LC-MS/MS-Applikation für die Untersuchung eines breiten Spektrums verschiedenster Substanzklassen verwendet werden. Die ESI (*Electrospray Ionization*)-Technik wird am häufigsten als Ionenquelle für die Analytik von biologischen Proben eingesetzt¹⁹⁶.

1.1.1 Entwicklung der MRM-Methode

Die ESI-Technik stellt eine sanfte Ionisierungstechnik dar bei der zunächst relativ stabile Quasi-Molekül-Ionen ($[M-H]^-$, $[M+H]^+$, sowie Addukte des Moleküls mit Na^+ , NH_4^+ , HCO_2^- etc.) generiert werden und die Fragmentierung in der Ionenquelle gering gehalten wird. Erst durch eine induzierte Fragmentierung wird ein Produkt-Ionenspektrum erhalten. Je nach Polarität der angelegten Spannung, kann eine positive oder negative Ionisierung erfolgen, wobei der gewählte Modus maßgeblich von der Struktur des Analyten abhängig ist.

Die Mehrheit der publizierten Methoden auf dem Gebiet der Gallensäurenanalytik verwendet zur Quantifizierung der Analyten den SIM-Modus bei dem nur eine Massenspur aufgezeichnet wird. Gerade freie Gallensäuren, zeigen im Fragmentierungsprozess nur unzureichende Fragmentierungseigenschaften. Das *Precursor*-Ion wird hierbei selber als Produkt-Ion im Massenspektrometer selektiert^{197,198}. Diese Art der Detektion weist nur eine geringe Spezifität und ein niedriges Signal-Rausch-Verhältnis speziell in Gegenwart komplexer Matrices auf¹⁹⁹⁻²⁰². Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit eines Messverfahrens, zwischen dem Analyten und anderen Probenbestandteilen zu unterscheiden. In der Regel werden drei Identifizierungspunkte, d.h. ein *Precursor*-Ion und drei dazu gehörende Fragment-Ionen, als ausreichend angesehen, um eine hohe Spezifität zu erzielen. Im Vergleich zum SIM-Modus ermöglicht das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) das maximale Signal-Rausch-Verhältnis und wird somit vornehmlich zur Quantifizierung verwendet. Durch die Detektion mehrerer substanzspezifischer Massenübergänge wird eine höhere Sensitivität erreicht und auftretende Interferenzen durch Matrixbestandteile unterdrückt. Wenige Arbeiten verwenden den MRM-Modus für die Quantifizierung von Gallensäuren^{195,203,204}. Daher war das Bestreben zunächst eine massenspektrometrische Methode, welche auf Basis eines *Triple-Quadrupol*-Massenspektrometers den MRM-Modus verwendet, zu entwickeln. Für jeden Analyten wurden sowohl im positiven als auch negativen Ionenmodus die substanzspezifischen MRM-Übergänge ermittelt. Hierfür wurde die Standardlösung via Direkteinlass in die Elektrospraykammer des Massenspektrometers (API 4000 QTRAP®, SCIEX, Darmstadt, DE) eingebracht.

Gallensäuren stellen acide Moleküle dar, die über eine Carboxylgruppe verfügen, welche im negativen Modus leicht unter Generierung des Quasi-Molekül-Ions $[M-H]^-$ deprotoniert werden¹⁹⁷. Das deprotonierte Glycin-Molekül $[NH_2CH_2COO]^-$ (m/z 73.8) stellte das Hauptfragment-Ion im Produkt-Ionenspektrum aller Glycinkonjugierten Gallensäuren dar. Das Produkt-Ion, welches für die Bestimmung von Taurinkonjugierten Gallensäuren herangezogen werden kann, bildete sich durch die Abspaltung der deprotonierten Sulfongruppe $[SO_3]^-$ (m/z 79.8) aus dem Molekül. TAGGLIACOZZI et al. (2003) beschreiben die Bildung weiterer spezifischer Fragmente (m/z 124 $[NH_2CH_2CH_2SO_3]^-$ und m/z 107 $[CH_3CH_2SO_3]^-$) für Taurinkonjugierte Gallensäuren²⁰⁵. Durch manuelle Variation der CID (*Collision-Induced Dissoziation*)-Einheiten konnten jedoch keine weiteren Produkt-Ionen mit signifikanter Intensität für beide konjugierten Gallensäuregruppen erzeugt werden (vgl. Abbildung D-1 C & E).

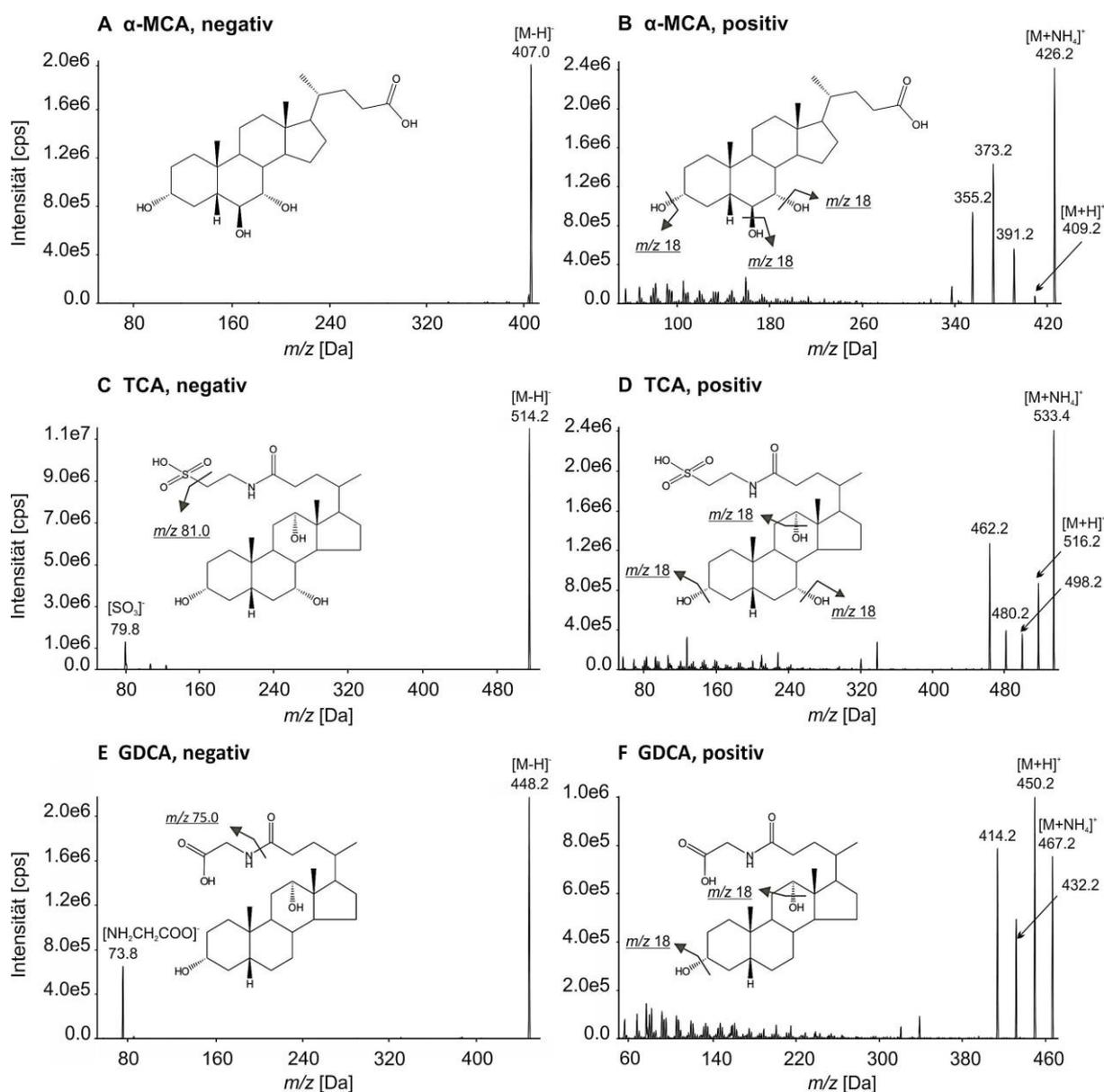


ABBILDUNG D-1 Produkt-Ionenspektrum ausgewählter Gallensäuren je im negativen und positiven Ionenmodus. **A & B:** α -MCA, **C & D:** TCA und **E & F:** GDCA.

Speziell freie Gallensäuren weisen, im Vergleich zu ihren amidierten Vertretern, nur eine geringe Neigung zur Fragmentierung auf, weshalb oftmals das *Precursor*-Ion auch als Produkt-Ion ausgewählt wurde^{197,198}. In der Kollisionszelle kommt es zu Zusammenstößen des selektierten ionisierten Vorläufer-Moleküls mit dem Kollisionsgas, wobei die Translationsenergie teilweise in Schwingungsenergie umgewandelt wird. Durch eine unimolekulare Dissoziation der aktivierten Ionen können Fragmentspektren generiert werden. Allerdings weisen Gallensäuren einen unpolaren, stabilen Sterannukleus auf, sodass die aufgebrachte Kollisionsenergie nicht ausreicht, um Fragment-Ionen zu bilden^{194,203}. Dieser beschriebene Effekt konnte in den durchgeführten MRM-Experimenten ebenfalls beobachtet werden. Im negativen Modus wurden für freie Gallensäuren ebenfalls keine substanzspezifischen Fragmentierungsmuster detektiert (vgl. Abbildung D-1 A). In der Arbeit von TAGGLIACOZZI et al. (2003) wurde erstmalig der positive ESI-Modus zur Ionisierung von Gallensäuren verwendet. Allerdings stellten sie, vergleichend mit der Ionisierung im negativen Modus, eine deutlich verringerte Intensität der Vorläufer-Ionen fest. Dafür zeigte sich ein wesentlich komplexeres Fragmentierungsmuster der Gallensäuren²⁰⁵. Auf Grundlage dieser Publikation, wurde ebenfalls der positive Ionisierungsmodus der ESI-Quelle verwendet. Schon bei niedrigen CID-Werten kam es bei allen Gallensäurenverbindungen zur Generation von Fragment-Ionen, die allesamt durch die Abspaltung von H₂O (*m/z* 18) erzeugt wurden. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von TAGGLIACOZZI et al. (2003) war eine signifikante Abnahme der Intensität des *Precursor*-Ions (Q1-Massenanalysator) um den Faktor 18 relativ zu den Ergebnisse, erzielt im negativen Ionenmodus erkennbar²⁰⁵ (vgl. Abbildung D-2).

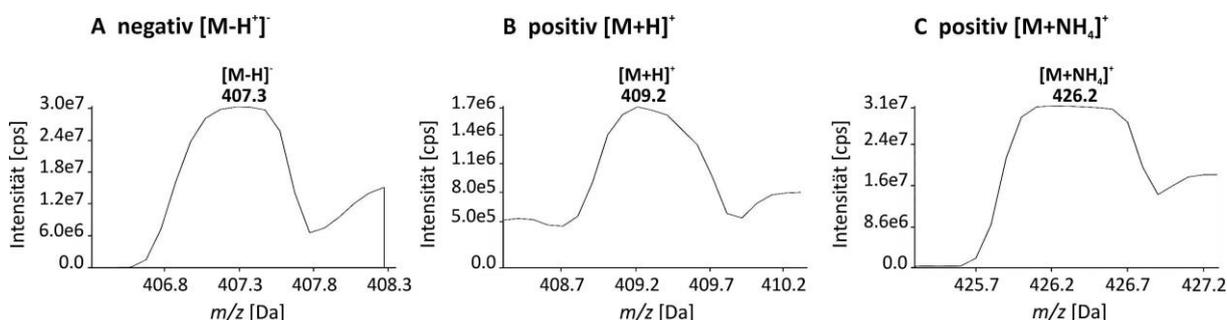


ABBILDUNG D-2 Vergleich der Intensitäten des *Precursor*-Ions vor der Fragmentierung im Q1 am Beispiel von CA. A: negativer Ionenmodus $[M-H]^+$, **B:** positiver Ionenmodus $[M+H]^+$, **C:** positiver Ionenmodus nach Zusatz von Ammoniumacetat und Bildung des Ammonium-Addukts $[M+NH_4]^+$.

Die Verwendung von *Modifiern* stellt eine gängige Praxis dar, um die Signalintensität speziell des intensivsten Massenübergangs zu erhöhen. Zudem weisen z.B. Ammonium-Addukte gute Fragmentierungseigenschaften auf²⁰⁶. Durch den Zusatz von Ammoniumacetat (10 mM) zur Analytlösung, bildete das Ammoniumaddukt $[M+NH_4]^+$ das intensivste Vorläufer-Ion (vgl. Abbildung D-2). Der Großteil der Fragment-Ionen von freien und Taurinkonjugierten Gallensäuren ergab sich durch den Verlust von NH₃ + H₂O (*m/z* 53), wogegen das Hauptprodukt-Ion der Glycinkonjugate durch den Verlust von H₂O (*m/z* 18) gebildet wurde (vgl. Abbildung D-1 B, D & F).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei der Verwendung des negativen Ionenmodus nur wenige auswertbare bzw. in Bezug auf die freien Gallensäuren keine relevanten Fragment-Ionen erhalten werden konnten, wohingegen im positiven Modus fragmentreiche Massenspektren resultierten. Durch den Zusatz von Ammoniumacetat und der Bildung des Ammoniumaddukts, konnte die Intensität um ein Vielfaches gesteigert werden. Da die Methode in Hinblick auf ein Screening von Gallensäurenmetaboliten in verschiedenen biologischen Matrices entwickelt werden sollte, ist ein hohes Maß an Selektivität und Sensitivität unabdingbar. Daher war es von Interesse, dass möglichst viele Massenübergänge in die Methode implementiert werden. Fortan wurde für alle Experimente ausschließlich der positive Ionenmodus verwendet.

Allerdings wurden für die Monohydroxygallensäuren LCA und Iso-LCA disparate Ergebnisse erhalten, da auch unter der Verwendung von Modifiern die größte Intensität nur im negativen Ionenmodus erzielt wurde. Die Bildung von Fragment-Ionen war weder im positiven noch im negativen Modus zu beobachten, weshalb die Detektion der beiden Substanzen im SIM-Modus durch Messung des deprotonierten *Precursor*-Ions [M-H]⁻, erfolgte.

Die Einstellungen der Beschleunigungs- und der Fokussierungsspannungen des Ionenpfades des Massenspektrometers wurden mit Hilfe der „Automatic Compound Optimazation“ der Analyst[®] Software (Version 1.6.1) für jede Substanz individuell optimiert und geeignete Fragmente für die Quantifizierung ermittelt. Anschließend wurden weitere Parameter wie das *Curtain Gas* und das *Collision Gas* manuell angepasst, um eine höchstmögliche Sensitivität der massenspektrometrischen Methode zu generieren.

Das *Curtain Gas*, ein inerter Stickstoffstrom, welcher dem Ionenstrom entgegengesetzt ist, verhindert das Eindringen von Staubpartikeln, ungeladenen Ionen, Lösungsmittelresten sowie von Puffer-Ionen in das Hochvakuumssystem des Massenspektrometers. Durch die Kollision mit Analytmolekülen, werden diese gegebenenfalls abgelenkt, wodurch es zu einer Abnahme der Sensitivität kommen kann. Von Seiten des Herstellers wird empfohlen, die Größe des *Curtain Gas* möglichst hoch anzusetzen, um den massenselektiven Detektor hinreichend vor Kontaminationen zu schützen. Je nach den Polaritätseigenschaften der Verbindungen hat der Wert des *Curtain Gas* maßgeblich einen Einfluss auf die Intensität der Signale. Bei den verhältnismäßig polaren Vertretern, wie den konjugierten Gallensäuren der α -MCA, CA und β -MCA, wurde eine Maximierung der Intensität mit zunehmender Größe des *Curtain Gas* identifiziert, wohingegen bei unpolaren Gallensäuren (z.B. DCA) der gegenteilige Effekt beobachtet werden konnte. Generell konnte bei der Einstellung des *Curtain Gas* von 10 psi die maximale Intensität für eine Quantität der Substanzen ausgemacht werden. Nach Auskunft des Herstellers, sollte das *Curtain Gas* jedoch die Marke von 20 psi nicht unterschreiten, um eine Verunreinigung des massenspektrometrischen Systems vorzubeugen.

Neben dem *Curtain Gas* wurde die optimale Einstellung für das *Collision Gas* evaluiert. Es befindet sich in der Kollisionszelle und bestimmt den Druck des Kollisionsgases. Bei der Mehrzahl der Analyten wurden die höchsten Signale bei der Einstellung „high“ erzielt. Lediglich bei unpolaren Gallensäuren wie 7-KLCA, 6,7-DKLCA und GLCA wurde die maximale Intensität bei der Option „low“ erhalten.

Auf diese Art wurden für alle Gallensäurenmetabolite die passenden massenspektrometrischen Parameter ermittelt und in eine gemeinsame MRM-Multimethode integriert. Eine zusammenfassende Darstellung aller bestimmten MRM-Übergänge ist im Teil I – Anhang, Tabelle I-2 und I-3 angegeben. Um die Sicherheit der qualitativen Aussage zu steigern wurden jeweils die drei intensivsten Massenübergänge in die Messmethode integriert. Der intensivste Massenübergang, der *Quantifier (Qnt)*, wurde in der späteren Multimethode zur Quantifizierung der Metabolite herangezogen. Die *Qualifier 1* und *2 (Qal 1* und *2)* dienen der Identifizierung des Analyten in der Probe. Nur wenn alle drei Massenübergänge zur selben Retentionszeit signifikant vom Grundrauschen unterscheidbar waren, wurde der Analyt als „identifiziert“ in der Probe angesehen. Als weiteres Qualitätsmerkmal diente das Verhältnis der Peakflächen von *Qnt*, *Qal 1* und *Qal 2* zueinander.

1.1.2 Entwicklung der flüssigkeitschromatographischen Methode

Auch bei einer selektiven LC-MS/MS lassen sich Interferenzen nicht vollständig ausschließen. Oftmals rühren diese aus der Fragmentierung von isobaren Massenübergängen strukturell verwandter Isomere oder nicht-verwandter Metabolite her. Bei der Betrachtung der MRM-Übergänge wurde eine Vielzahl von Interferenzen identifiziert, die durch isobare bzw. isomere Gallensäuren hervorgerufen werden. Die Mehrheit der endogenen Gallensäuren treten als Strukturanaloga auf, die sich lediglich in der Position und Stereoisomerie der Hydroxylgruppe am Sterangerüst im Sinne einer Stellungsisomerie voneinander differenzieren (siehe Abbildung D-3). Dadurch können keine selektiven Massenübergänge ermittelt werden. Aufgrund der verringerten Spezifität muss die Retentionszeit als zusätzliches Selektionsmerkmal herangezogen werden.

Auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zahlreicher Gallensäuren einerseits und den großen Unterschieden in den Polaritäten zwischen individuellen Gallensäuren andererseits, stellt die chromatographische Trennung eine große analytische Herausforderung dar¹⁷⁷. Das Ziel der Entwicklung der flüssigkeitschromatographischen Methode war es daher, eine Basislinientrennung aller isobaren Substanzen zu erzielen, um deren selektive Quantifizierung zu gewährleisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Chromatographiesäulen mit unterschiedlichen chemischen Modifizierungen und Laufmittelzusammensetzungen getestet und gegebenenfalls einigen Optimierungen unterworfen^{203,205,207}. Der große Unterschied in den physiochemischen Eigenschaften, wie Lipophilie und Polarität, bedingt eine sorgfältige Auswahl der stationären Phase und des Laufmittelsystems. In der Mehrheit der Publikationen, veröffentlicht auf dem Gebiet der Gallensäureanalytik, wurde eine gute chromatographische Trennung auf herkömmlichen C18 Umkehrphasen (RP, *Reversed Phase*) erreicht. RP-Phasen werden universell für die chromatographische Trennung eines breiten Substanzspektrums eingesetzt. Die Trennung der Analyten erfolgt hierbei in abnehmender Reihenfolge der Polarität der Komponenten. Im Vergleich zu lipophilen Verbindungen gehen polare Analyten weniger Wechselwirkungen mit der apolaren stationären Phase ein und werden zuerst eluiert.

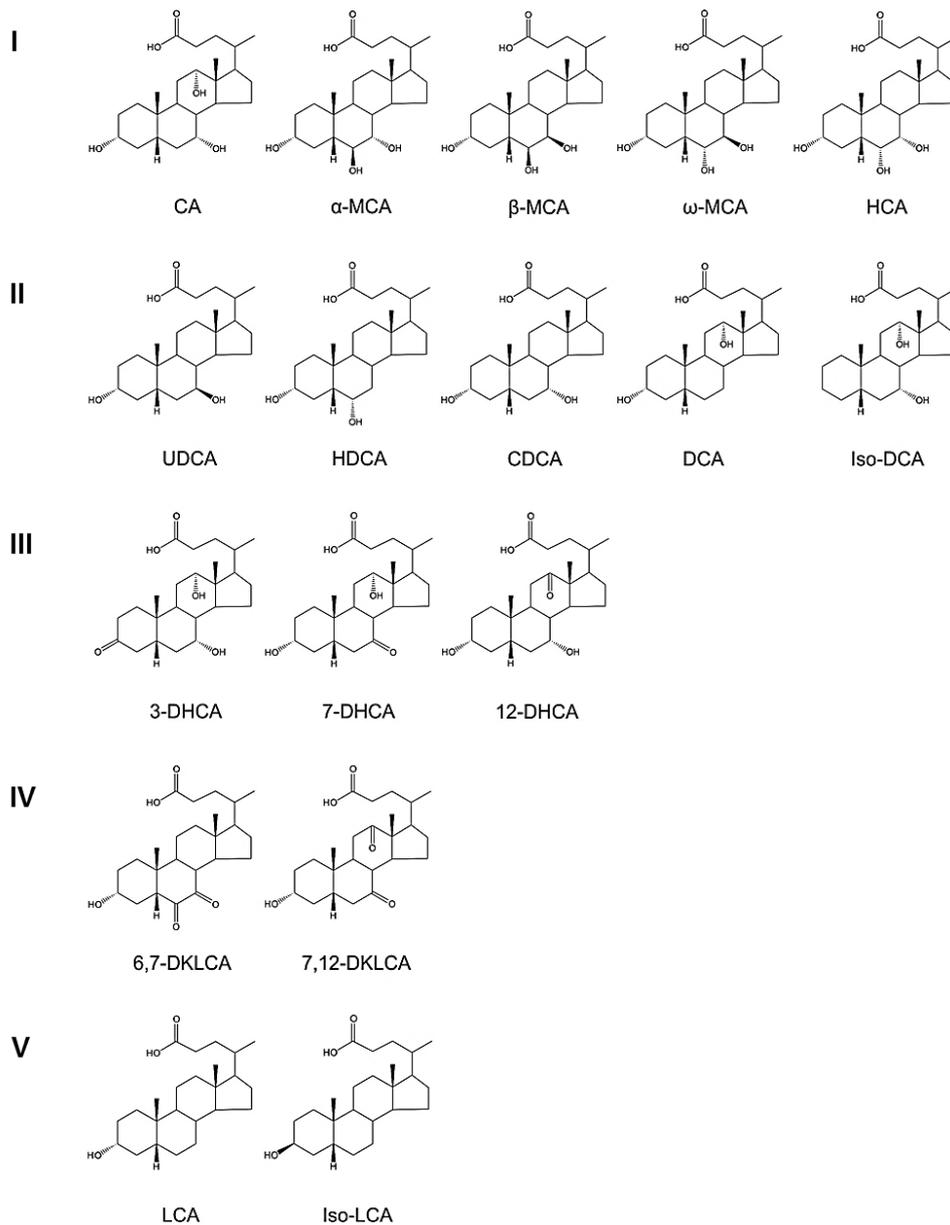


ABBILDUNG D-3 Relevante unkonjugierte Gallensäuremetabolite, die als Strukturisomere vorliegen. Die Mehrzahl der Moleküle unterscheidet sich nur in der Konfiguration und Position der Hydroxylgruppen am Sterankörper.

Gallensäuren sind amphiphile Moleküle, die aus einem hydrophoben Sterankörper und einer hydrophilen Seitenkette aufgebaut sind. Diese beiden Faktoren beeinflussen maßgeblich das Retentionsverhalten auf RP C18-Phasen¹⁹³.

Die im Zusammenhang der LC-MS-Technik am häufigsten Lösungsmittel sind Acetonitril, Methanol und Wasser. Allerdings kann ein hoher Anteil an Acetonitril zu einem Mangel an Ladungsträgern in der ESI-Quelle führen, wodurch die Ionisation der Analyten diskriminiert wird (Ionensuppression). Daher wurde das Trennverhalten der einzelnen Chromatographiesäulen zunächst mit Wasser als Eluent A und Methanol als Eluent B studiert.

1.1.2.1 Einfluss der stationären Phase

Jede Säule weist andere Eigenschaften in Hinblick auf das Säulenmaterial, Länge der Trennstrecke, Partikeldurchmesser etc. auf. Aus diesem Grund konnte keine Verallgemeinerung bei der Erstellung und Übertragung von Gradienten und Flussraten auf weitere Trennsäulen getroffen werden. Als Qualitätskriterium für die Beurteilung der Chromatographieleistung galten eine Basislinientrennung aller Analyten – speziell der Stellungsisomere – die Peakform, eine hohe chromatographische Auflösung sowie eine möglichst geringe Analysendauer. Folgende Chromatographiesäulen wurden durch eine Vorselektion ausgewählt:

- RP CN (Nucleodur, 100 x 3.0 mm i.D., 3.0 μm , Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
- RP C18 (Nucleoshell, 100 x 2.0 mm i.D., 2.7 μm , Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
- RP C18 (Nucleoshell, 150 x 2.0 mm i.D., 2.7 μm , Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
- RP C18 (Kinetex, 150 x 2.1 mm i.D., 2.6 μm , Phenomenex[®] Inc.)

Es wurden nur Säulen mit einem Partikeldurchmesser $> 2 \mu\text{m}$ verwendet, da bei der Verwendung von kleineren Partikelgrößen mit einem hohen Gegendruck gerechnet hätte werden müssen, was die Benutzung einer UPLC-Anlage (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) notwendig gemacht hätte.

Durch die Verwendung einer RP C18-Trennsäule, wie es in der einschlägigen Literatur empfohlen wird, sollte eine hohe Retardation auf Basis des hydrophoben Grundcharakters des Sterannukleus erreicht werden. Sowohl die 'Nucleoshell'- als auch die 'Kinetix'-Technologie basieren auf teilporösen Partikeln, bestehend aus einem festen Kern umgeben von einer homogenen Schale aus porösem Kieselgel. Die Verwendung von teilporösen Materialien hat sich in den letzten Jahren bewährt, da im Vergleich zu vollporösen stationären Phasen, der Massentransfer und damit die Schnelligkeit und Effizienz der Trennung beschleunigt werden kann.

Eine Trennstrecke von 100 mm erwies sich als zu kurz, um eine ausreichende Auflösung der Zielanalyten zu generieren. Durch die Erhöhung der Trennstrecke wurde zwar eine deutlich bessere Trennung und chromatographische Resolution generiert, allerdings konnte weder durch Variation des Gradienten, der Fließgeschwindigkeit noch durch einen Flussgradienten eine zufriedenstellende Trennung der isobaren Verbindungen α -MCA, β -MCA, ω -MCA und HCA sowie ihrer Taurinkonjugate T- α -MCA und T- β -MCA erzielt werden.

Als Alternative zur traditionellen Selektivität auf traditionellen RP C18-Phasen wurde daher das Chromatographieverhalten auf einer Cyanopropyl-modifizierten Kieselgelphase (Nucleodur CN-RP) geprüft. Laut Herstellerangaben zeigt diese Trennsäule ein erweitertes Selektivitätsspektrum, ein hervorragendes Retentionsverhalten für polare bis ungesättigte Verbindungen und wird für die Analyse von Steroid-Verbindungen empfohlen. Im Hinblick auf die isobaren Verbindungen, zeigte die Chromatographiesäule jedoch ein schlechtes Retentionsverhalten – viele Strukturanaloga konnten nicht voneinander getrennt werden.

Resultierend aus den Ergebnissen wurde für die fortlaufende Optimierung des flüssigkeitschromatographischen Systems die RP C18-Trennsäule (Kinetex, 150 x 2.1 mm i.D., 2.6 μm , Phenomenex[®] Inc.) verwendet. Vergleichend mit der 'Nucleoshell'-Trennsäule (150 x 2.0 mm i.D., 2.7 μm , Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) wurde die chromatographische Separation einer Vielzahl der Stellungsisomere erzielt.

Da jedoch durch die Modifikation des Gradienten und der Flussrate keine Verbesserung der chromatographischen Trennung erreicht wurde, erfolgte im nächsten Schritt eine Optimierung des Eluentensystems zunächst durch Variation des pH-Wertes.

1.1.2.2 Einfluss des pH-Wertes

In bereits veröffentlichten chromatographischen Methoden für die Gallensäureanalytik wurde eine große Auswahl verschiedenster Eluenten mit variierenden pH-Werten angewandt. Sowohl neutrale pH-Werte^{208,209}, als auch saure^{193,198} und basische Bedingungen^{200,210} für das mobile Phasensystem wurden in der Literatur beschrieben. Um das chromatographische Retentionsvermögen der Analyten auf der RP-C18 Phase zu optimieren, wurden verschiedene Laufmittelsysteme mit differierenden pH-Werten getestet (vgl. Abbildung D-4).

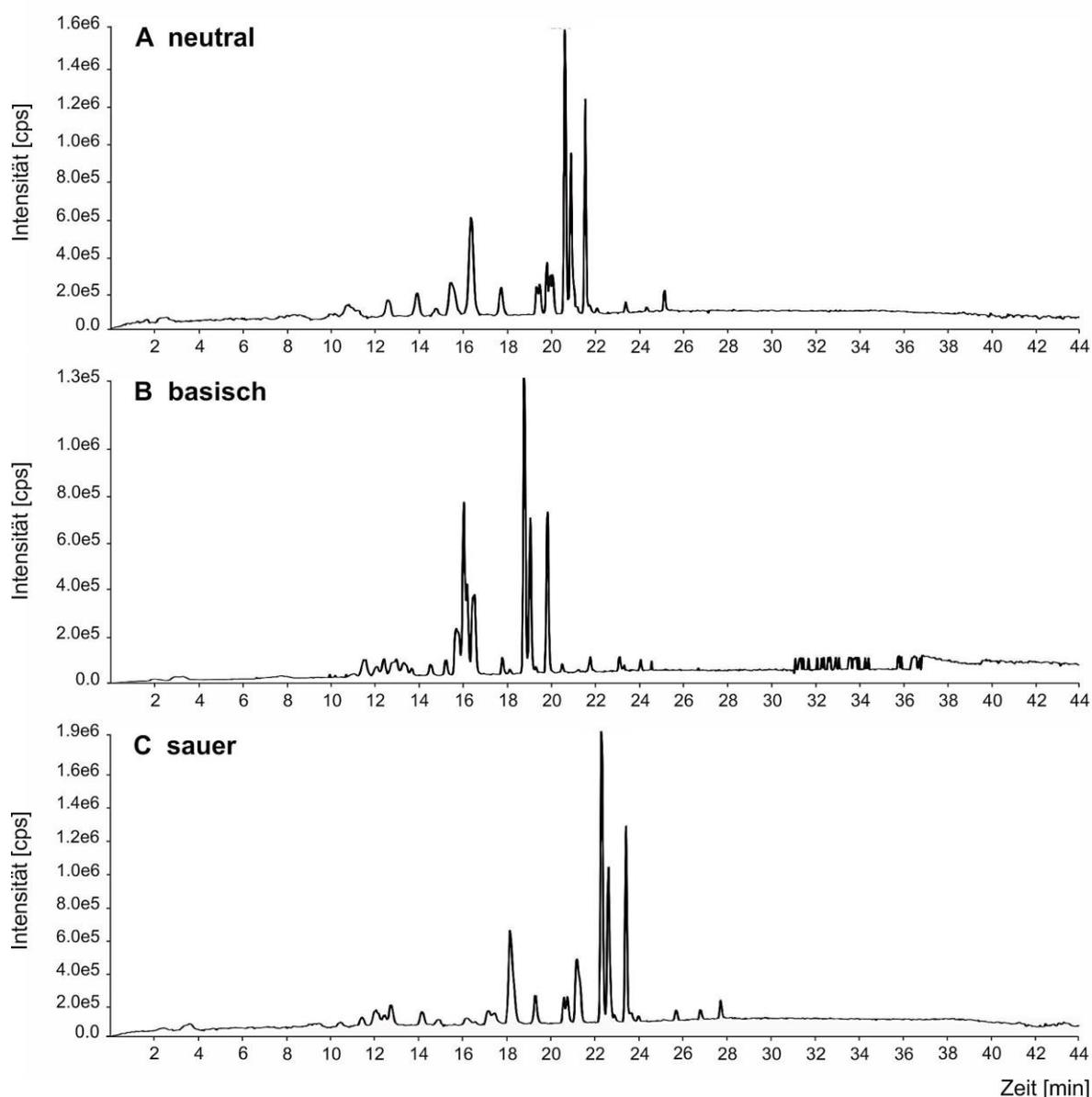


ABBILDUNG D-4 Einfluss des pH-Werts des Eluenten auf das chromatographische Verhalten von Gallensäuren. **A:** neutral, **B:** basisch (0.1% Ammoniumhydroxid, pH 8), **C:** sauer (0.1% FA); (dargestellt ist der TIC – Total Ion Chromatogram), Eluent A: Wasser, Eluent B: MeOH, Säule: RP C18 (Kinetex, 150 x 2.1 mm i.D., 2.6 µm, Phenomenex® Inc.). FA: Ameisensäure (Formic Acid), MeOH: Methanol

Die chromatographischen Eigenschaften von Gallensäuren werden maßgeblich durch den pH-Wert der mobilen Phasen beeinflusst¹⁹⁷. Taurinkonjugierte Gallensäure (pK_a-Wert ~ 1.5) zählen zu den Sulfonsäuren und stellen starke Basen dar⁴, die im pH-Wert-Bereich von 3 - 10 ionisiert vorliegen, wohingegen Glycinkonjugierte (pK_a-Wert 3.8 - 4.8) und freie Gallensäuren (pK_a-Wert 5.2 - 6.2) bei niedrigen pH-Werten mehrheitlich in protonierter Form existieren^{2,176} (vgl. Teil B – Theorie Nr. 2.2). Bei pH-Werten ≥ 7 spielen vordergründig nur noch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem unpolaren Sterangerüst und der stationären Phase eine Rolle.

Die Methoden von SCHERER et al. (2009) und CAI et al. (2012) basieren auf einem schwach basischen Eluentensystem (0.1% Ammoniumhydroxid in Methanol bzw. Wasser, pH 9 und pH 8)^{200,210}. Im Vergleich zum neutralen pH-Wert (vgl. Abbildung D-4 A) war im basischen Milieu eine signifikante Abnahme der Retention und eine Koelution einer Mehrzahl der Gallensäuren zu erkennen (vgl. Abbildung D-4 B). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Trennung speziell der Glycinkonjugierten und der unkonjugierten Substanzen durch den Zusatz von 0.1% Ameisensäure (FA, *Formic Acid*) substantiell gesteigert werden konnte. Der Grund hierfür liegt darin begründet, dass bei niedrigen pH-Werten diese Moleküle protoniert vorliegen, so dass der lipophile Charakter der Substanzen zunimmt, wodurch die Interaktionen zwischen den Analyten und der hydrophoben stationären Phase erhöht und die Zielanalyten stärker retardiert werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben hatte die Änderung des pH-Wertes einen unwesentlichen Einfluss auf das Retentionsverhalten der Taurinkonjugierten Gallensäuren^{193,203}. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass Eluenten mit neutralen und basischen pH-Werten nicht geeignet sind, um eine ausreichende chromatographische Auflösung der Gallensäuren zu generieren.

Da es sich bei Gallensäuren um schwach saure Verbindungen handelt und ihr chromatographisches Verhalten maßgeblich vom pH-Wert des Laufmittels beeinflusst wird, ist der Zusatz eines Puffers unabdingbar, um reproduzierbare Bedingungen zu generieren. Bei einer Konzentration von 0.1% FA und 20 mM Ammoniumacetat wurde die beste Auflösung sowie symmetrische Peaks über alle Gallensäurenderivate hinweg erzielt. Allerdings konnte nicht für alle isobaren Verbindungen eine Basislinientrennung erzielt werden.

Daneben stellt der Einsatz von Puffer bzw. *Modifiern* eine weitere Alternative dar, die Signalintensität zu beeinflussen. Die Ursache hierfür liegt in der Veränderung des Dampfdrucks des Lösungsmittels begründet, wodurch die Verdampfung in der Ionenquelle und die Ladungsverteilung auf der Tröpfchenoberfläche verändert werden. ALNOUTI et al. (2008) beschreiben, dass die Verwendung von Ammoniumbicarbonat die Intensität der Glycinkonjugierten Gallensäuren erniedrigte, während die Intensität der Taurinkonjugierten Verbindungen geringfügig gesteigert werden konnte¹⁹³. Insgesamt ist es bei der Verwendung der ESI wichtig keine nichtflüchtigen Additive einzusetzen, da diese sich nachteilig auf die Spraybildung und Ionisation auswirken.

1.1.2.3 Einfluss des Lösungsmittels

Wie bereits beschrieben stellen Acetonitril, Methanol und in einigen Fällen Ethanol gängige organische Lösungsmittel für die chromatographische Analyse von Gallensäuren dar. In Hinblick auf die Peakschärfe eignen sich Methanol und Ethanol eher als Acetonitril¹⁹⁴. Methanol weist ein größeres Vermögen auf hydrophobe Gallensalze zu solvatisieren und diese in Lösung zu halten.

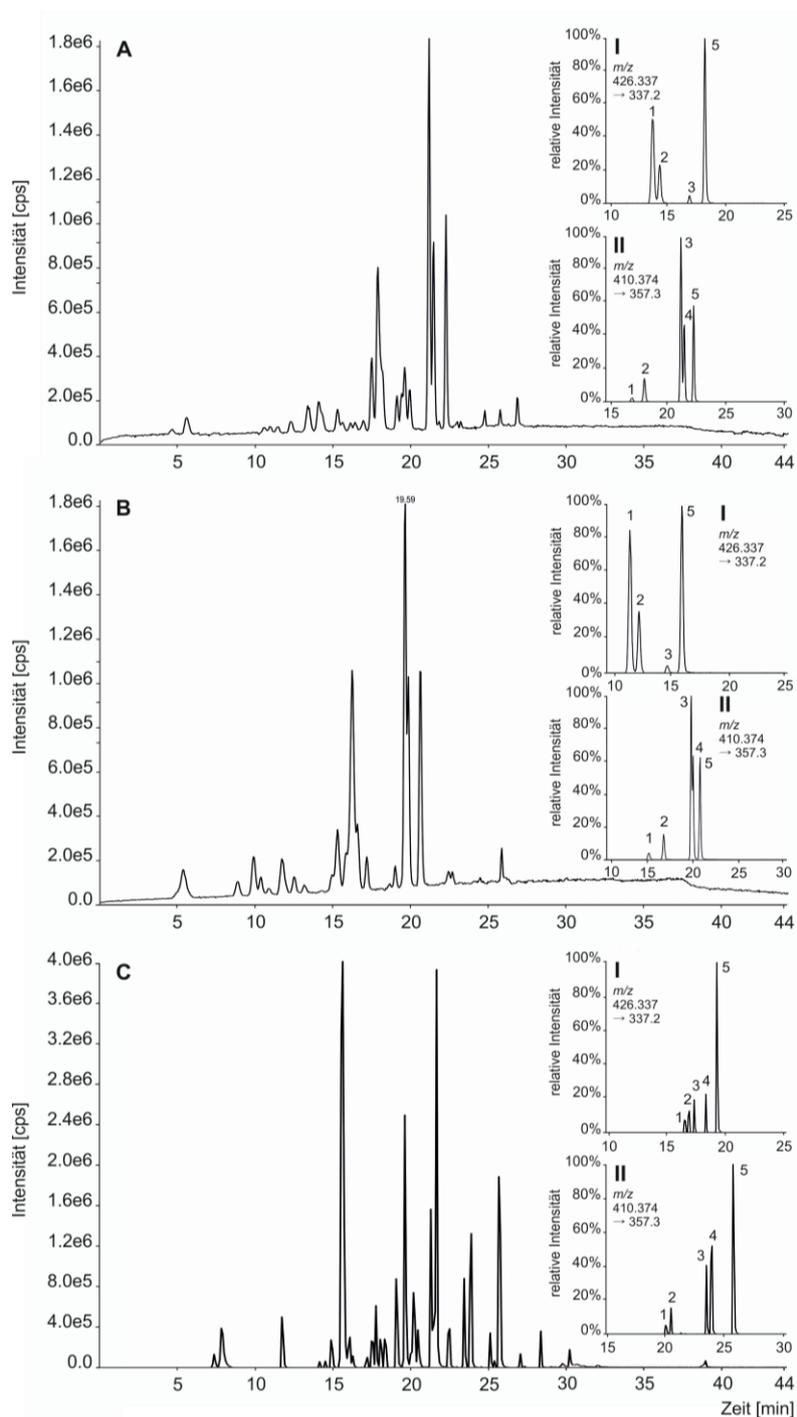


ABBILDUNG D-5 Einfluss des Lösungsmittels auf das Retentionsverhalten von Gallensäuren. (TIC, Ausschnitt) **A:** MeOH, **B:** ACN, **C:** ACN/MeOH (3/1, v/v), Eluent A: Wasser + 20 mM Ammoniumacetat + 0.1% FA, Säule: RP C18 (Kinetex, 150 x 2.1 mm i.D., 2.6 μ m, Phenomenex[®] Inc.); XIC (*Extracted Ion Chromatogram*): **I** (m/z 426.337 \rightarrow 337.2): 1: ω -MCA, 2: α -MCA, 3: β -MCA, 4: HCA, 5: CA, **II** (m/z 410.374 \rightarrow 357.3): 1: UDCA, 2: HDCA, 3: CDCA, 4: DCA, 5: Iso-DCA. Die Bedeutung der Abkürzungen der Gallensäuren ist in Teil I – Anhang Nr. 1 Tabelle I-1 angegeben. MeOH: Methanol, ACN: Acetonitril, FA: Ameisensäure (*Formic Acid*)

Bei der Verwendung von Methanol als Eluent B (+ 20 mM Ammoniumacetat, 0.1% FA) konnte keine Trennung speziell der beiden Strukturisomere CDCA und DCA erzielt werden (vgl. Abbildung D-5 A II). Die Basislinientrennung dieser beiden Verbindungen stellte in der Vergangenheit eine oftmals beschriebene chromatographische Herausforderung dar, wobei in vielen Fällen keine Trennung erreicht werden konnte und die Analyten daher als Summenparameter quantifiziert wurden^{194,195}. Weiterhin konnte keine vollständige Basislinientrennung von ω - und α -MCA generiert werden (vgl. Abbildung D-5 A I).

Durch den Wechsel auf ACN als Eluent B (+ 20 mM Ammoniumacetat, 0.1% FA) wurden die Trenneigenschaften speziell der MCA-Derivate deutlich erhöht (siehe Abbildung D-5 B I), eine Basislinientrennung aller isobaren Substanzen konnte dennoch nicht erhalten werden. Die Separation von DCA und CDCA konnte auch durch Variation des Gradientenverlaufs und der Flussrate nicht verwirklicht werden. Durch die Addition von Methanol zu Acetonitril (1/3, v/v) wurden die Polarität der mobilen Phase und damit die Löslichkeit der Gallensäuren erhöht. Dies resultierte in einer gesteigerten chromatographischen Auflösung (vgl. Abbildung D-5 C).

In Abbildung D-5 ist der Einfluss des Lösungsmittels auf das Chromatographieverhalten von Gallensäuren auf der verwendeten RP C18-Phase dargestellt, welcher den finalen Gradienten repräsentiert. Im Laufe der Methodenentwicklung wurden weitere Analyten, vor allem Oxogallensäuren, zum Multistandard ergänzt, wodurch die Unterschiede in der Anzahl der Peaks und der Intensität im Vergleich zu den Chromatogrammen (Abbildung D-5 und D-5 B) zu erklären sind. Die Retention an der RP C18-Phase unter den optimierten Chromatographiebedingungen ist gewährleistet. Es wurden symmetrische Peaks mit einem ausreichenden Abstand zur Totzeit erhalten. Als Mindestretentionszeit wurde das Zweifache des Totvolumens angesehen.

Die chromatographische Basislinientrennung aller Stellungsisomere konnte erzielt werden, was die selektive Quantifizierung von früher oftmals als Summenparametern bestimmten Analyten ermöglicht (siehe Abbildung D-6). Für die isobaren Glycin- und Taurinkonjugierten Gallensäuren konnte durch die Verwendung des finalen Eluentensystems und Gradientenverlaufs ebenfalls eine Basislinientrennung erreicht werden (siehe Teil I – Anhang Nr. 2 Abbildung I-1).

Die Reihenfolge der Retention von Gallensäuren auf RP C18-Phasen ist wesentlich von der Anzahl, der Position und der Regiochemie der Hydroxylgruppen am Sterangrundgerüst abhängig. Bei konjugierten Gallensäuren hat zusätzlich die chemische Struktur des Substituenten einen wesentlichen Einfluss auf das Retentionsverhalten. Aufgrund der partiell polaren Eigenschaften von Taurinkonjugierten Gallensalzen retardieren diese weniger auf der stationären Phase und eluieren vor den Glycinkonjugierten und freien Verbindungen. Die Elutionsreihenfolge innerhalb der Familie der Gallensäuren ist abhängig von der Zahl und Stereochemie der Hydroxylgruppen am Sterankörper sowie ihrem Vermögen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden¹⁹³. Allgemein eluieren Tri- vor den Di- und Monohydroxygallensäuren (vgl. Abbildung D-6).

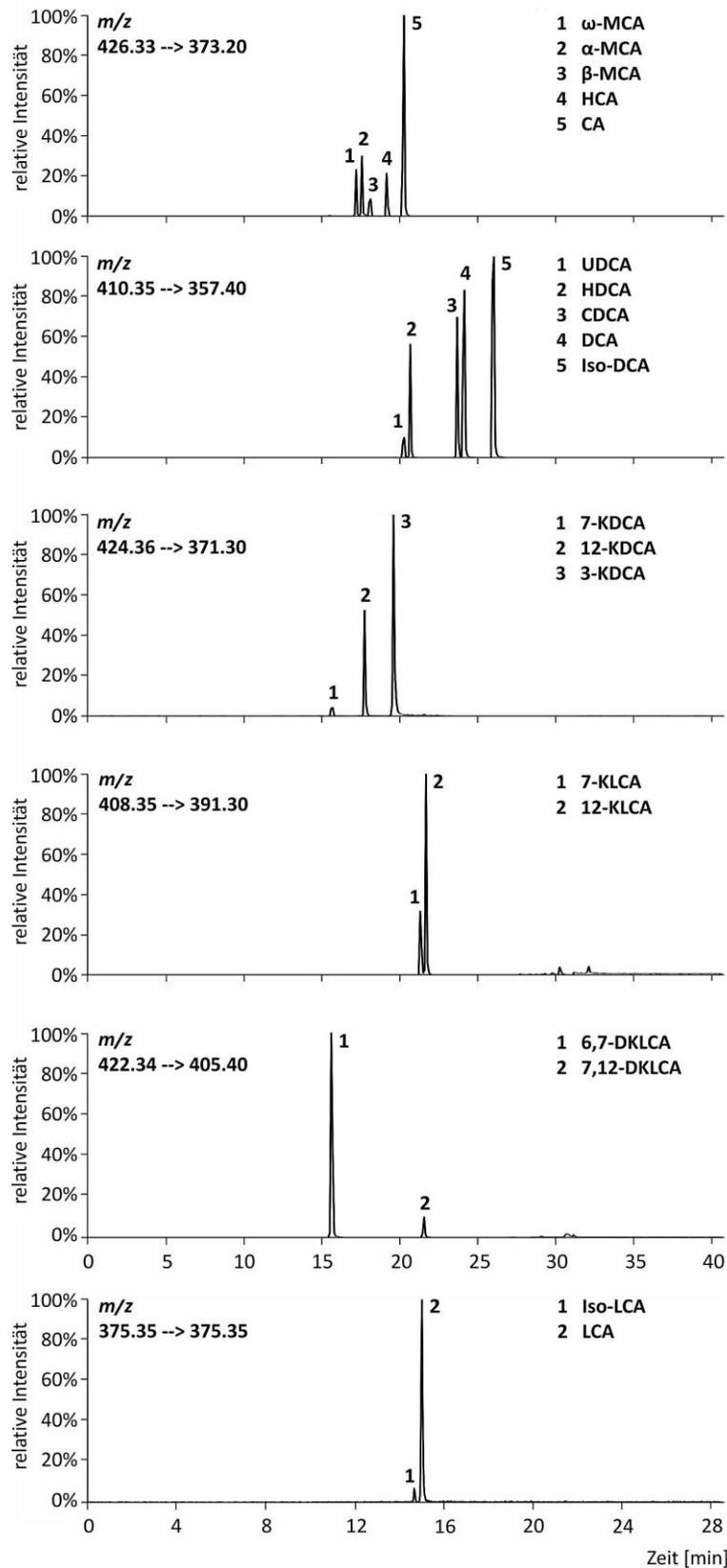


ABBILDUNG D-6 XIC (Extracted Ion Chromatogram) der isomeren Verbindungen am Beispiel der freien Gallensäuren bei den dargestellten Massenübergängen (Ausschnitt). Die chromatographische Basislinientrennung konnte ebenfalls für die Taurin- und Glycinkonjugierten Gallensalze erzielt werden (vgl. Teil I – Anhang Nr. 2 Abbildung I-1).

1.1.2.4 Finale Optimierung

Eine hochauflösende Chromatographie trägt dazu bei, die Wahrscheinlichkeit einer Koelution isobarer Substanzen zu minimieren. Eine Einteilung der Messmethode in zeitlich begrenzte Perioden, deren Zeiträume sich aus der chromatographischen Trennung ergeben, kann sinnvoll sein, um die Messdauer (DT, *Dwell Time*) der einzelnen Massenübergänge zu erhöhen und damit das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Hierbei werden die Massenübergänge einer Substanz nur im Bereich der Retentionszeit akquiriert und nicht über die gesamte Analysendauer gemessen. Die DT für den *Qnt*, den Massenübergang der final zur Quantifizierung herangezogen wird, wurde auf 150 msec festgesetzt, während die Scandauer von *Qa/1* und *Qa/2* jeweils 20 msec betrug (siehe Teil I – Anhang Nr. 1 Tabelle I-2) .

Die Verwendung von internen Standards (IS) stellt daher für die Quali- und Quantifizierung eine zuverlässige Methode zur Erzielung präziser und sicherer Messergebnisse dar. Bei einem IS handelt es sich um eine Substanz, die natürlich in der Probe nicht vorkommt, aber chemisch und strukturell die gleichen Eigenschaften wie der Zielanalyt besitzt und sich lediglich im Molekulargewicht von diesem unterscheidet²¹¹. Daher finden in der quantitativen LC-MS/MS durchweg stabil-isotopenmarkierte Verbindungen Anwendung. Der Einsatz von isotopenmarkierten Derivaten gleicht Unterschiede in der Ionisierungseffizienz aus und kompensiert Signalschwankungen, verursacht einerseits durch leichte Variationen in der Probenvorbereitung und vor allem durch die Probenmatrix bedingte Unterdrückung bzw. Verstärkung der Ionisation. Bei biologischen Proben ist es wichtig, auf die relative Molekülmasse des markierten Derivats zu achten, welches idealerweise um 3 Masseeinheiten höher sein sollte als das Molekulargewicht des Zielanalyten, um Interferenzen durch natürliche Isotopen auszuschließen²¹². Durch Normalisierung des gemessenen Analytsignals im Vergleich zum Signal des IS können Verluste und Ineffizienzen durch eventuelle Variationen bei der Injektion, Probenaufarbeitung, Matrixeffekte, Chromatographie und der Ionisierung nivelliert werden²¹¹. Auf Grund der enormen Vielfalt der Gallensäuren und der hohen Anzahl an Analyten, war es nicht möglich für jede Verbindung eine interne stabil-isotopenmarkierte Verbindung zu verwenden. Wenn keine isotopenmarkierten Derivate zur Verfügung stehen, müssen Homologe d.h. strukturverwandte Moleküle eingesetzt werden. Daher wurde sich bei der Quantifizierung von freien Gallensäuren auf d4-CA und bei konjugierten Gallensäuren auf d4-GCDCA und bezogen.

1.2 Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode

Der Einsatz von hochsensitiven Messtechniken wie Massenspektrometern im Bereich der klinischen Analytik macht eine gute Probenvorbereitung zwingend notwendig, da unbehandelte Matrixproben nicht ohne vorherige Aufarbeitung analysiert werden können. Die Probenmatrix beeinflusst einerseits die Ionisierung der Zielanalyten in der Ionenquelle und andererseits das chromatographische Trennverhalten. Anorganische Salze mit hoher Ionisierungsstärke können das Ionensignal reduzieren, so dass die Qualität der Messung leidet. Neben dem Einsatz eines IS ist eine sorgfältige Probenvorbereitung der Goldstandard für die Kompensierung von Suppressions- und Matrixeffekten.

Die einfachste und schnellste Möglichkeit der Probenvorbereitung ist die Proteinfällung durch Zugabe eines organischen Lösemittels. Diese Art der Aufarbeitung ist in vielen Fällen aber nicht ausreichend, da neben Proteinen weitere Störsubstanzen in der Matrix vorhanden sind und mit dieser Technik nicht abgetrennt werden können. Die deutlich effektivere Art der Probenvorbereitung stellt die Festphasenextraktion (SPE, *Solid Phase Extraction*) dar. Die Mehrheit der analytischen Methoden für die Bestimmung von Gallensäuren bedient sich der SPE-Technik für die Probenvorbereitung. Allerdings werden ebenfalls simple Extraktionsverfahren mit organischen Lösungsmitteln zur Aufarbeitung von biologischen Proben in der Literatur beschrieben.

1.2.1 Festphasenextraktion (SPE)

Die SPE ist eine leistungsstarke Art der Probenvorbereitung und Probenanreicherung mit dem Ziel, einen oder mehrere Analyten durch gezielte Wechselwirkung an einer stationären Phase zu adsorbieren und gleichzeitig störende Begleitstoffe sowie Matrixbestandteile zu entfernen. Im Anschluss kann der adsorbierte Analyt durch schrittweise Erhöhung der Elutionskraft der Eluenten wieder vom Phasenmaterial entfernt werden. Durch verschiedene Waschschriffe mit unterschiedlich starken organischen Lösungsmitteln, bzw. Lösungsmitteln unterschiedlicher pH-Werte, werden weiterhin unerwünschte Probenkomponenten entfernt. Neben der Adsorption von Analytmolekülen an der Festphase können an deren Stelle auch Matrixmoleküle gebunden werden und vom Zielanalyten separiert werden, allerdings ist in diesem Fall keine Aufkonzentrierung der Probe möglich. Durch die Vielfalt an chemisch modifizierten Adsorbentien und Retentionsmechanismen kann eine spezifischere und selektive Trennung der Analyten erfolgen²¹³.

Allgemein werden der SPE-Applikation in der modernen Analytik mehrere Vorteile zugesprochen. Durch die Anreicherung von Analyten wird die chromatographische Empfindlichkeit erhöht und die Nachweisgrenze verbessert. Die Entfernung von Störkomponenten und Minimierung von Matrixeffekten, speziell bei komplexen Matrices, schützt das Messsystem vor übermäßiger Kontamination. Weitere Vorteile im Vergleich zu Extraktionsverfahren bietet die SPE durch einen geringeren Verbrauch an Lösungsmitteln sowie ein höheres Maß an Aufkonzentrierung des Analyten²¹⁴.

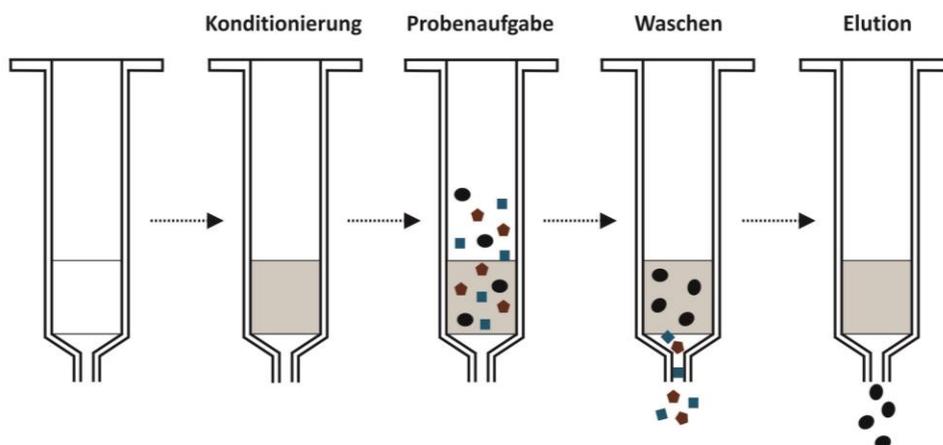


ABBILDUNG D-7 Schematische Darstellung eines SPE-Versuches zur Anreicherung der Probenmoleküle an der Festphase und zur Entfernung von Störkomponenten. Die SPE-Applikation umfasst folgende Schritte: **Konditionierung:** Solvatisierung und Aktivierung des Adsorbens, damit der Analyt reproduzierbare Wechselwirkungen mit der Festphase eingehen kann. **Probenaufgabe:** Die Probenlösung wird durch die Festphase gezogen. **Waschen:** Analytmoleküle (schwarz) werden am Adsorbens angereichert, Lösungsmittelmoleküle und Störkomponenten (blau und braun) werden entfernt. **Elution:** Analyt (schwarz) wird durch einen geeigneten Eluenten vom Sorbens entfernt. (eigene Darstellung)

Vier bereits publizierte Methoden zur Isolierung und Aufkonzentrierung von Gallensäuren aus biologischen Matrices mittels SPE wurden getestet und die prozentuale Wiederfindungsrate für fünf repräsentative Gallensäuren mit unterschiedlichen Polaritätseigenschaften bestimmt. In allen Arbeiten wurde RP C18-Festphasen eingesetzt, allerdings unterschieden sich die Extraktionsprotokolle grundlegend in den Polaritätseigenschaften der verwendeten Lösungsmittel (siehe Abbildung D-8).

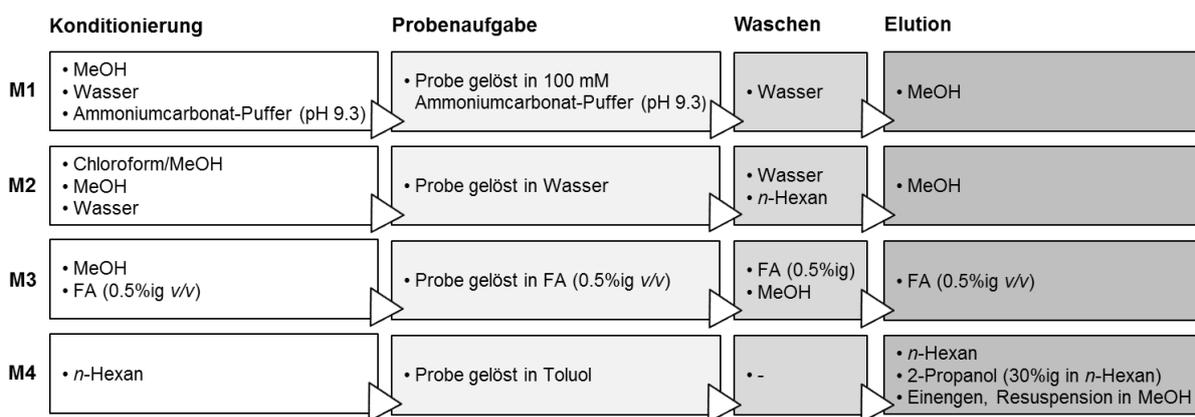


ABBILDUNG D-8 Getestete SPE-Methoden für die Probenaufarbeitung von Gallensäuren. **M1:** Methode nach BURKHARD et al. (2005)¹⁹⁸, **M2:** Methode nach PERWAIZ et al. (2001)²⁰⁷, **M3:** YE et al. (2007)¹⁹⁴, **M4:** McDONALD et al. (2007)²¹⁵, M: Methode, MeOH: Methanol, FA: Ameisensäure (*Formic Acid*)

Für die Evaluation einer geeigneten Probenvorbereitung wurden fünf in ihren Polaritätseigenschaften differierende Sterolverbindungen, namentlich TCDCA, GUDCA, CA, 3-DHCA und 6,7-DKLCA (dargestellt in abnehmender Polaritätsreihenfolge) ausgewählt, um die Effizienz der SPE-Applikation bewerten zu können.

Die Auswertung erfolgte anhand der Quantifizierung der Metabolite über Integration der erhaltenen Peakflächen und die daraus berechneten Wiederfindungsraten der einzelnen SPE-Schritte (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.3.1 Gleichung (1)).

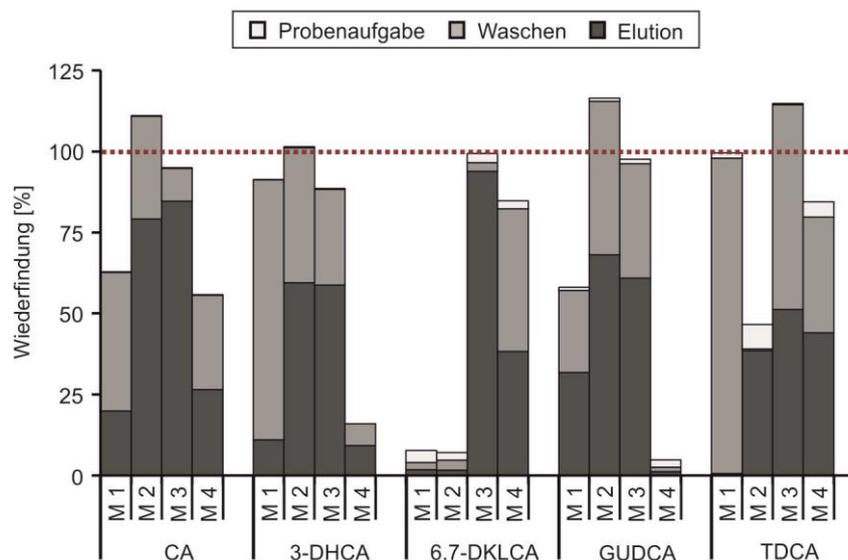


ABBILDUNG D-9 Wiederfindungsrate ausgewählter Gallensäuren nach Festphasenextraktion. M1: Methode nach BURKHARD et al. (2005)¹⁹⁸, M2: Methode nach PERWAIZ et al. (2001)²⁰⁷, M3: YE et al. (2007)¹⁹⁴, M4: McDONALD et al. (2007)²¹⁵, MeOH (Methanol), FA (Ameisensäure)

BURKHARD et al. (2005) demonstrieren eine für Plasmaproben geeignete Probenvorbereitungsmethode mit Wiederfindungsraten zwischen 85% - 105% für die analysierten Gallensäuren (Methode M1). Die Konditionierung des Adsorbens erfolgt zunächst mit Methanol gefolgt von Wasser und einem basischen Ammoniumcarbonat-Puffer (pH 9.3)¹⁹⁸. Große Verluste an CA, 3-DHCA und GUDCA konnten bei der Probenaufnahme ermittelt werden, wohingegen 6,7-DKLCA und TCDCA an der stationären Phase adsorbiert wurden. Die Stärke der Wechselwirkung zwischen der Festphase und dem Analyten hängt wesentlich von dem verwendeten Lösungsmittel und dem pH-Wert ab. Im basischen pH-Wert-Bereich liegen die Gallensalze deprotoniert vor, wodurch die Hydrophilie der Substanzen erhöht wird und die Wechselwirkung mit der unpolaren stationären Phase abnimmt. Die Variation des pH-Werts hat dagegen keinen Einfluss auf den Protonierungsgrad der Taurinkonjugate. Allerdings wurde im Waschschrift (Wasser) nahezu vollständig (97%) das gebundene TCDCA von der stationären Phase eluiert während beim 6,7-DKLCA nur wenig Verlust (2%) beobachtet werden konnte. Mit MeOH konnte das adsorbierte 6,7-DKLCA nur in sehr geringen Mengen (4%) eluiert werden. Es ist anzunehmen, dass der Analyt so stark an die Festphase gebunden wurde, so dass die Elutionskraft von Methanol nicht ausreicht, um die Wechselwirkungen von 6,7-DKLCA mit der stationären Phase zu überwinden.

Bei der Methode M2 (PERWAIZ et al. (2001) wurde das Adsorbens zunächst mit einem Gemisch aus Chloroform/ Methanol (2/1, v/v), reinem Methanol und Wasser konditioniert und im Anschluss die Analyten, gelöst in Methanol, aufgegeben²⁰⁷. Wie bereits bei der Methode M1 beobachtet werden konnte, gingen die polaren Gallensäuren, speziell die Trihydroxygallensäure CA sowie 3-DHCA und die konjugierten Spezies TCDCA und GUDCA, nur wenig Wechselwirkung mit der stationären Phase ein. Große Anteile (39% - 80%) gingen bereits bei der Aufgabe der Analytlösung verloren. 6,7-DKLCA, als der hydrophobste Vertreter der selektierten Gallensäuren, wurde hinreichend an der Festphase gebunden. Auch im Waschschritt mit Wasser und *n*-Hexan konnten keine Verluste ausgemacht werden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Aufarbeitungsmethode M1, reichte auch hier das Elutionsvermögen von Methanol nicht aus, um den Analyten vom Festphasenmaterial zu readsorbieren und aus dem chromatographischen System zu entfernen.

Bei der Festphasenkonditionierung unter sauren Bedingungen (Methode M 3, YE et al. (2007)¹⁹⁴) konnte bereits ein Analytverlust von 84% CA, 59% 3-DHCA, 51% TCDCA, 61% GUDCA und sogar 94% der Oxogallensäure 6,7-DKLCA bei der Probenaufgabe detektiert werden.

MCDONALD et al. (2007) veröffentlichten ein Protokoll für die Isolierung von Cholesterol und verwandter Sterole nach vorheriger Probenextraktion nach BLIGH & DYER anwendbar für Plasma- und Gewebeproben (Methode M 4)²¹⁵. Auch hier zeigte sich eindeutig, dass mit der Probenvorbereitungsmethode kein befriedigendes Gesamtergebnis für alle verwendeten Gallensäuren erzielt werden konnte.

o Zusammenfassung

In der Literatur publizierte SPE-Methoden wurden getestet, wobei sich eindeutig zeigte, dass auf Grund der strukturellen Diversität und den Unterschieden in den Polaritäten der verschiedenen Gallensäuren keine zufriedenstellende Aufarbeitung mittels SPE in einem Schritt generiert werden kann. Daneben umfasst die Probenvorbereitung mittels SPE viele Einzelschritte, was sich negativ auf die Analysendauer niederschlägt. Da die Methode in Hinblick auf den Einsatz in Hochdurchsatzverfahren mit mehreren hundert Proben eingesetzt werden sollte, war es erstrebenswert, eine schnelle und effektive Probenaufarbeitung zu etablieren.

1.2.2 Extraktionsverfahren

Das Prinzip eines Extraktionsverfahrens beruht darauf, dass bei der Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels (Extraktionsmittel) aus einer Flüssigkeit oder einem Feststoff die zu analysierende Komponente, welche sich bevorzugt darin löst, vom Extraktionsgut abgetrennt werden kann (= Extrakt). Zur Isolierung des Extrakts vom Extraktionsrückstand wird in der Regel ein Trennverfahren (z.B. Zentrifugation) nachgeschaltet (siehe Abbildung D-10).

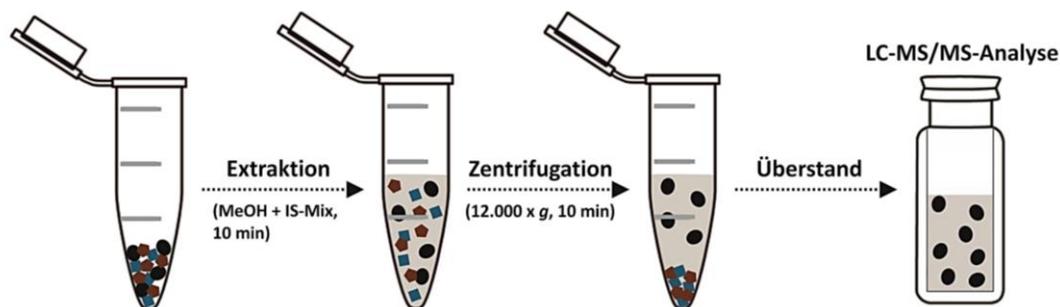


ABBILDUNG D-10 Schematische Darstellung des angewandten Probenextraktionsverfahrens mittels SLE (**Solid-Liquid-Extraction, Fest-Flüssig-Extraktion**) für Fäzes-Proben. Nach der Zugabe von Methanol und IS wird die Probe 10 min unter konstanten Schütteln extrahiert, zentrifugiert und der Überstand nach Überführung in ein Probenvial mittels der entwickelten LC-MS/MS-Multimethode analysiert. MeOH: Methanol, IS: Interner Standard. (eigene Darstellung)

Grundlage für die Beschreibung des Extraktionsprozesses bildet das NERNST'sche Verteilungsgesetz:

$$k_i = \frac{C_1}{C_2} \quad (1)$$

k_i Verteilungskoeffizient der Substanz
 $C_{1/2}$ Konzentration der Substanz in der Phase 1 und 2

Um eine schnelle und effiziente Extraktion zu erreichen, sollte bei einer Feststoffextraktion dem Lösungsmittel eine große Austauschfläche und kurze Diffusionswege geboten werden. Bei Feststoffen wird dies durch vorheriges Zerkleinern des Feststoffes und bei Flüssigkeiten (LLE, *Liquid-Liquid-Extraction*) durch Rühren der Lösung erreicht.

Für jede Fragestellung und Matrix muss ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden. Hierfür ist es notwendig die Eigenschaften des zu lösenden Stoffes zu kennen, um abschätzen zu können, ob mit dem gewählten Lösungsmittel eine ausreichende Extraktionsausbeute erzielt werden kann. Im Idealfall sollte das Lösungsmittel nur die zu bestimmende Substanz herauslösen und weitere Probenbestandteile unberührt lassen. Gallensäuren weisen auf Grund ihrer strukturellen Diversität starke Unterschiede in ihren Polaritätseigenschaften auf. Allerdings wurde bereits beschrieben, dass sie ein gutes Lösungsverhalten in Methanol zeigen. Wie bereits bei der Entwicklung der SPE-Applikation beschrieben, wurde für die Bestimmung und Bewertung der Effektivität der Extraktion die fünf genannten Gallensäuren (TCDC, GUDCA, CA, 3-DHCA und 6,7-DKLC) ausgewählt. Ziel war es, eine Aufarbeitung zu generieren, die es ermöglicht, sowohl die polaren als auch die semi-polaren Sterolderivate in einem einzigen Extraktionsschritt mit zufriedenstellender Ausbeute zu isolieren.

Aus den ermittelten Konzentrationen wurde nach Abzug der endogenen Gallensäurekonzentration der undotierten Matrix die prozentuale Wiederfindungsrate ermittelt (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.3.2 Gleichung (2)). Die Leistungsfähigkeit des Extraktionsverfahrens ist beispielhaft für die Matrix Zellkulturnährmedium in Abbildung D-11 dargestellt. Eine zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse (Fäzes, Fettgewebe und Plasma) des finalen Probenextraktionsverfahrens mit Methanol wird im Teil I – Anhang Nr. 2 Tabelle I-4 angegeben.

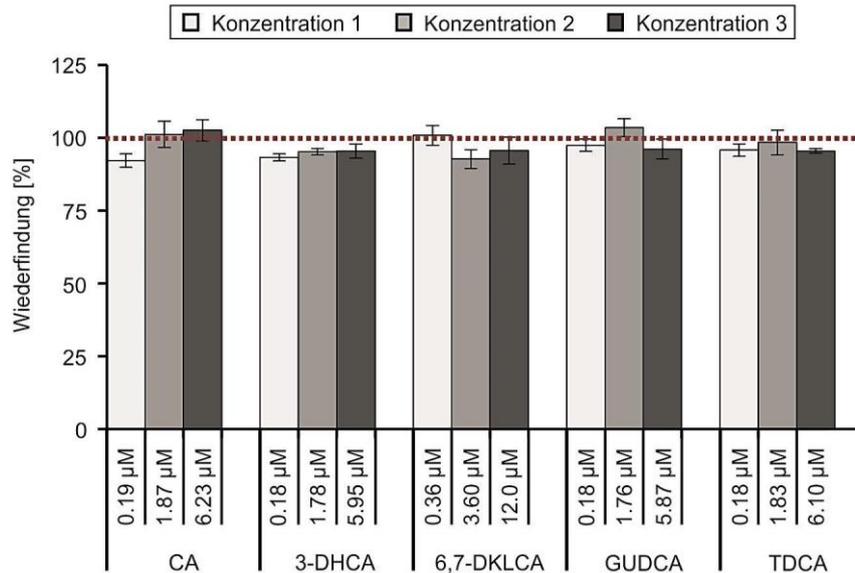


ABBILDUNG D-11 Prozentuale Wiederfindungsrate von Gallensäuren nach LLE (*Liquid-Liquid-Extraction*, Flüssig-Flüssig-Extraktion) mit Methanol als Extraktionsmittel (Zellkulturnährmedium, $n = 3$).

Bei einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate aller untersuchten Analyten von 97.1% (Plasma), 95.9% (Fäzes), 96.1% (Fettgewebe) und 97.2% zeigte CA mit 101.3% (Plasma), sowie 101.2% (Fäzes), 101.0% (Fettgewebe) und 98.7% (Zellkulturnährmedium) die höchste Wiederfindung.

Eine Abweichung von 100% bei der Wiederfindungsrate ist zulässig, wenn die Abweichung konstant und dadurch rechnerisch korrigierbar ist. Die relative Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$) von 0.8% - 4.8% zeugt von einer geringen Streuung der Messwerte und spiegelt somit die Genauigkeit des Extraktionsverfahrens wieder. Hierbei wurde im niedrigen Konzentrationsbereich eine größere Variation der Messwerte festgestellt, wohingegen bei höheren Konzentrationen eine bessere Wiederfindungen beobachtet werden konnte. Sowohl für die ausgewählten Gallensäuren wurden durchweg gute Wiederfindungsraten über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich erhalten.

o Zusammenfassung

Vollends konnte für die Analytik von Gallensäuren ein Schnellverfahren mittels Extraktion für die Probenaufarbeitung realisiert werden, die es ermöglicht, eine große Anzahl an Proben zeitnah ohne großen Aufwand zu bearbeiten.

1.3 Methodenvalidierung

Allgemein versteht man unter Validierung den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit und Qualität einer Methode. Der tatsächliche notwendige Umfang einer Validierung, hängt von der Art und dem Gebrauch in der Analytik ab. Der Schwerpunkt der Validierung lag darauf, zu zeigen, dass die entwickelte LC-MS/MS-Analysenmethode für die Quantifizierung von Gallensäuren in komplexen Matrices wie Plasma, Fäzes, Fettgewebe und Fermentationsmedium geeignet ist, um zuverlässige und reproduzierbare Daten zu generieren. Hierfür wurden die folgenden relevanten Verfahrensmerkmale: Linearität, Präzision, Richtigkeit, Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze charakterisiert.

1.3.1 Linearität und linearer Arbeitsbereich

Die Linearität einer Methode ist für einen bestimmten Konzentrationsbereich gegeben, wenn sich das Messsignal direkt proportional zur Analytkonzentration verhält. Die untere Grenze bildet die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze, die obere Grenze wird in der Regel durch „Sättigung“ des Detektorsystems verursacht. Erfolgt die Überprüfung der Linearität nur in Proben, die den reinen Analyt in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten, so wird lediglich die Linearität des Detektors ermittelt (= Grundkalibrierung)²¹⁶. Daher ist es zwingend notwendig die Linearität bei verschiedenen Konzentrationen in der vorliegenden Matrix (Plasma, Fäzes, Fettgewebe und Fermentationsmedium) ebenfalls durchzuführen (= Matrixkalibrierung).

1.3.1.1 Grundkalibrierung

Gemäß der Definition für Linearität sind verschiedene mathematische Kalibrierfunktionen für ein analytisches Verfahren möglich. Generell sollte eine Kalibrierfunktion 1. Ordnung einer quadratischen Regression (2. Ordnung) bevorzugt werden.

Die Linearität der LC-MS/MS-Methode für jeden Analyten wurde zunächst visuell überprüft. Dazu wurde das Verhältnis aus Peakfläche des Analyten (A) zum korrespondierenden IS ($= A_A / A_{IS}$) gegen den Quotienten aus Konzentration des Analyten und Konzentration des IS ($= c_A / c_{IS}$) aufgetragen und subjektiv beurteilt. Es wurde der Regressionskoeffizient R^2 für das lineare und das quadratische Kalibriermodell ermittelt (siehe Tabelle D-1), um den Grad der Anpassung der Kalibrierfunktion an die Kalibrierwerte zu erfassen. Der größere Wert entspricht dem Modell mit der besseren Anpassung²¹⁶.

Eine weitere qualitative Aussage zur Auswahl des bevorzugten Kalibriermodells kann über die berechneten Reststandardabweichungen S_R und S_{RQ} (vgl. Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3, Gleichung (4) & (5)) der linearen und quadratischen Kalibriergeraden getroffen werden. Ist $S_R < S_{RQ}$, so ist ein linearer Zusammenhang gegeben, im anderen Falle ist die quadratische Regression zu bevorzugen.

TABELLE D-1 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Grundkalibrierung (Auszug).

Analyt	Parameter der linearen und quadratischen Regression (n = 5)			
	R ² (1. Ordnung) (MW ± SD)	R ² (2. Ordnung) (MW ± SD)	S _R	S _{RQ}
CA	0.997 ± 0.002	0.998 ± 0.003	0.0352	0.0378
DCA	0.997 ± 0.002	0.998 ± 0.001	0.0701	0.0741
12-KDCA	0.997 ± 0.002	0.998 ± 0.001	0.0162	0.0172
DHCA	0.997 ± 0.004	0.998 ± 0.002	0.0160	0.0171
TCA	0.783 ± 0.084	0.917 ± 0.067	0.7608	0.3454
TLCA	0.963 ± 0.013	0.986 ± 0.011	0.0970	0.1315
GCA	0.996 ± 0.003	0.999 ± 0.001	0.0278	0.0300
GDCA	0.997 ± 0.002	0.997 ± 0.002	0.0550	0.0920

R²: Regressionskoeffizient, S_R: Reststandardabweichung (lineare Regression), S_{RQ}: Reststandardabweichung (quadratische Regression), MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

Der Großteil der Substanzen wies im untersuchten Konzentrationsbereich eine sehr gute Linearität auf. Für 97% der Metabolite konnte ein Korrelationskoeffizient $R^2 \geq 0.995$ erzielt werden (vgl. Teil I – Anhang Nr. 2 Tabelle I-5). Problematisch gestalten sich die Gallensäuren TCA und TLCA, für welche deutlich schlechtere Korrelationskoeffizienten ($R^2 < 0,970$) erhalten wurden. Die Auftragung der Kalibrierpunkte bedingt keine ideale Gerade, vielmehr wurde der Verlauf einer Sättigungskurve im oberen Konzentrationsbereich festgestellt (vgl. Abbildung D-12). Zwischen der Analytkonzentration und dem Messsignal besteht im gewählten Messbereich kein direkt proportionaler Zusammenhang.

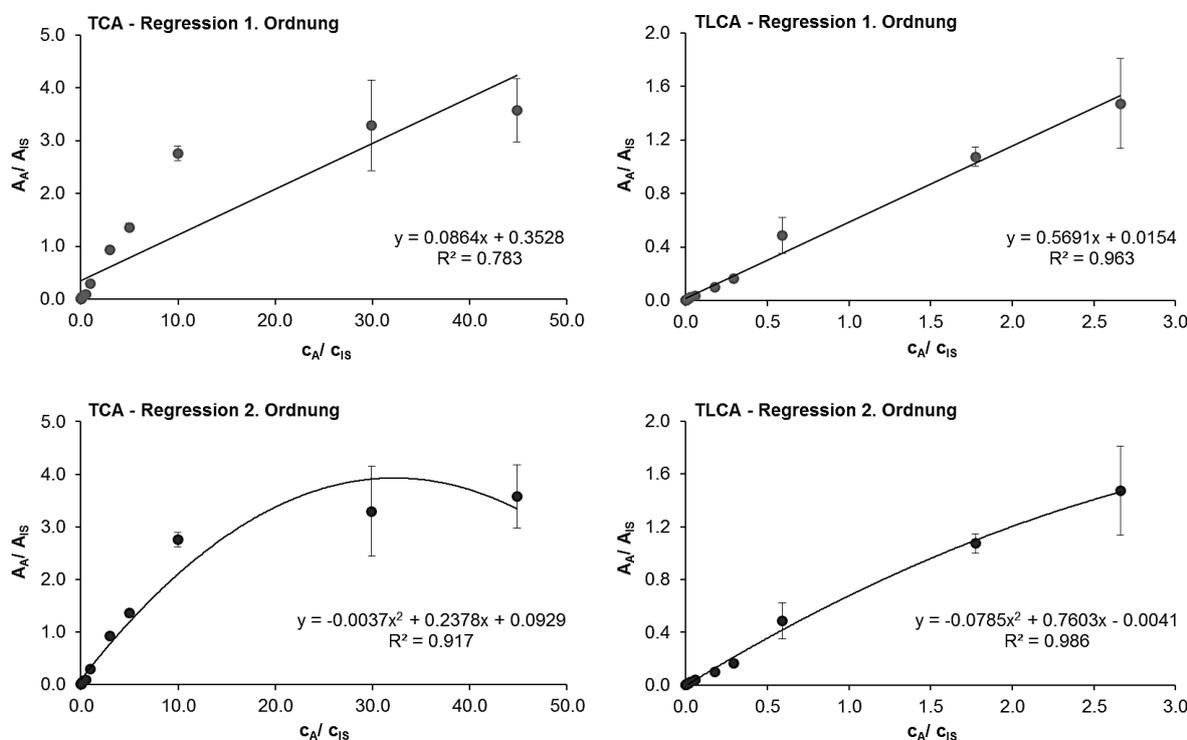


ABBILDUNG D-12 Prüfung der Linearität im Rahmen der Grundkalibrierung (Systemlinearität) beispielhaft für TCA und TLCA. Graphisch dargestellt sind die Kalibrierfunktionen 1. Grades (lineare Regression) und 2. Grades (quadratische Anpassung) sowie die erhaltenen Geradengleichungen und Regressionskoeffizienten R^2 . Aufgetragen sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung je Messpunkt (n = 5).

Die mit Hilfe von Gleichung (9) (vgl. Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3) für den Test nach MANDEL berechnete Prüfgröße (PG) zeigt allerdings nur für TCA ($504 > 12.25$, F-Wert für $P = 0.01$, $f_1 = 1$, $f_2 = n - 3$), dass die Verringerung der Restvarianz, die sich aufgrund der Wahl eines Modellansatzes höherer Ordnung gegenüber dem Regressionsmodell 1. Ordnung ergibt, signifikant ist. Im Falle von TLCA wurde ein PG von $0.22 < 12.25$ (F-Wert für $P = 0.01$, $f_1 = 1$, $f_2 = n - 3$) erhalten, so dass der Unterschied als nicht signifikant und die Kalibrierfunktion im untersuchten Arbeitsbereich als linear anzusehen ist.

Um eine Auswertung mittels quadratischer Regression zu verhindern, wurden einzelne Verfahrensschritte geprüft und als erster Ansatz der Konzentrationsbereich der nicht-linearen Funktion eingengt, mit dem Ziel eine akzeptable Linearität zu erzielen. Obwohl anhand des Anpassungstest nach MANDEL gezeigt werden konnte, dass das lineare Regressionsmodell die Messdaten von TLCA hinreichend beschreibt, wurde aufgrund des visuellen Eindrucks einer Unlinearität, speziell im hohen Konzentrationsbereich, der Messbereich ebenfalls verkleinert.

TABELLE D-2 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Grundkalibrierung nach Verkleinerung des Kalibrierbereichs (Auszug).

Analyt	Parameter der linearen und quadratischen Regression (n = 5)			
	R ² (1. Ordnung) (MW ± S)	R ² (2. Ordnung) (MW ± S)	S _R	S _{RQ}
TCA	0.998 ± 0.003	0.997 ± 0.002	0.0532	0.0569
TLCA	0.998 ± 0.002	0.996 ± 0.003	0.0037	0.0040

R²: Regressionskoeffizient, S_R: Reststandardabweichung (lineare Regression), S_{RQ}: Reststandardabweichung (quadratische Regression), MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

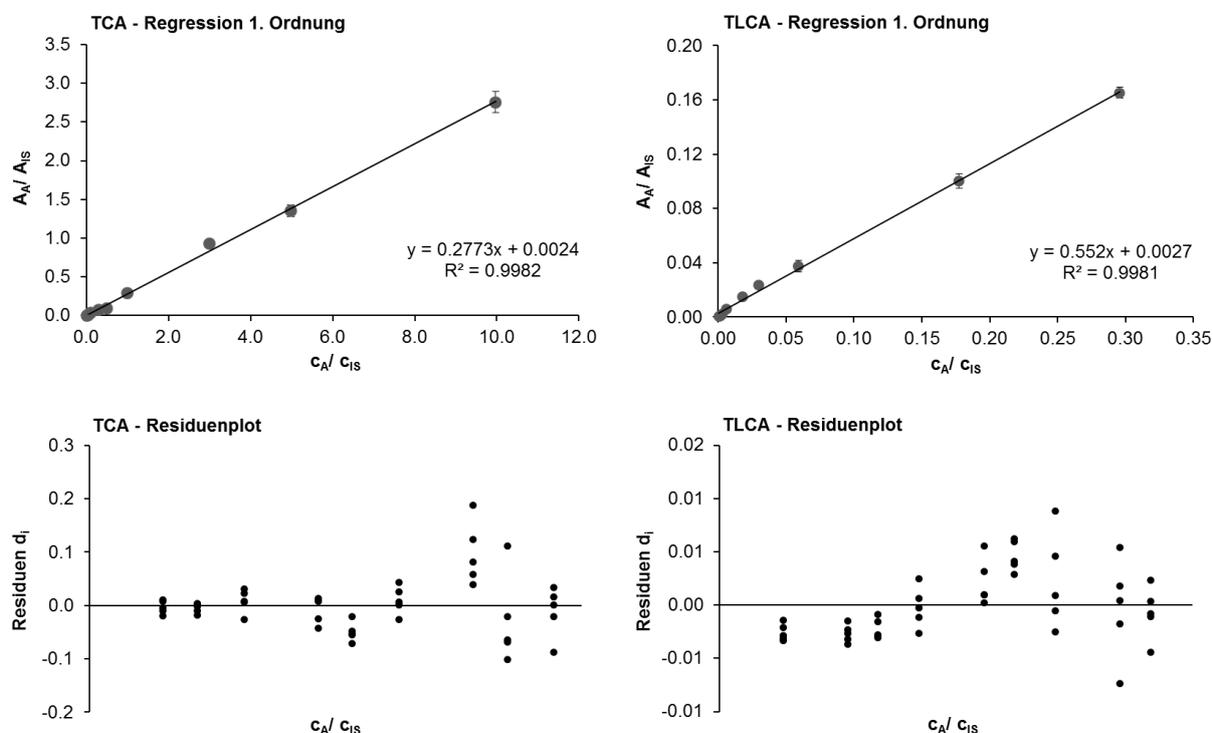


ABBILDUNG D-13 Prüfung der Linearität im Rahmen der Grundkalibrierung (Systemlinearität) beispielhaft für TCA und TLCA nach Verkleinerung des Kalibrierbereiches. Graphisch dargestellt sind die Kalibrierfunktionen 1. Grades (lineare Regression) sowie der Residuenplot. Aufgetragen sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung je Messpunkt (n = 5).

Abbildung D-13 zeigt die Kalibriergeraden für die Analyten TCA und TLCA nach Verkleinerung des Arbeitsbereiches, die beide aufzeigen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen dem Messsignal und der Konzentration besteht.

Weiterhin wurde mit einer Residualanalyse überprüft, ob das gewählte Regressionsmodells die Messergebnisse hinreichend beschreibt. Residuen d_i stellen ein Maß für die vertikale Streuung (y-Achsenrichtung) der Signalwerte um die Regressionsgerade dar (vgl. Gleichung (3) Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3). Ist die Wahl des Modells korrekt, so müssen die Residuen um den Wert 0 ohne eine erkennbare Verteilungsstruktur streuen (Normalverteilung). Der graphische Verlauf der Residuen in Abhängigkeit der Konzentration ist in Abbildung D-13 für TCA und TLCA beispielhaft dargestellt. In beiden Fällen ist konnte ein idealer Verlauf beobachtet werden d.h. der gewählte lineare Modellansatz wird als richtig angesehen.

Um das Maß der Streuung der Kalibrierpunkte bei einer Konzentration bewerten zu können, wurde das Präzisionsmaß, repräsentiert durch den relativen Variationskoeffizienten C_V , aus der Standardabweichung s und dem Mittelwert \bar{x} berechnet (vgl. Gleichung (11) Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.3). Gemäß den Vorgaben der FDA (*US Food and Drug Administration*) für bioanalytische Methodvalidierung kann ein C_V von 15% noch als akzeptabel eingestuft werden²¹⁷. Dieses Kriterium wurde von 97% aller untersuchten Analyten erreicht, 29% der berechneten C_V s lagen in einem sehr guten Bereich von $< 10\%$.

Ein weiteres Gütekriterium bei der Kalibrierungsbewertung ist die Verfahrensstandardabweichung S_V (vgl. Gleichung (10) Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3). Diese ist auf die Mitte des Konzentrationsbereiches (Abszisse des Schwerpunktes der Regressions- bzw. der Kalibriergeraden) normiert. Eine zusammenfassende Darstellung aller qualitätsrelevanten Verfahrenskenndaten ist dem Teil I – Anhang Nr. 2 Tabelle I-5 zu entnehmen.

TABELLE D-3 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Grundkalibration. Dargestellt sind die Parameter, die zur Beurteilung der Qualität der Linearität durch lineare Regression erforderlich sind.

	Lineare Regression (n = 5)			
	Steigung m (MW ± SD)	R ² (MW ± SD)	S _V [µM] (MW ± SD)	C _V [%] (MW ± SD)
CA	0.769 ± 0.021	0.997 ± 0.002	0.051 ± 0.001	10.44 ± 0.29
DCA	1.974 ± 0.088	0.997 ± 0.002	0.049 ± 0.002	10.69 ± 0.49
12-KDCA	0.419 ± 0.039	0.997 ± 0.002	0.068 ± 0.007	14.19 ± 1.48
DHCA	0.574 ± 0.019	0.997 ± 0.004	0.037 ± 0.001	12.17 ± 0.39
TCA	0.277 ± 0.011	0.998 ± 0.002	0.235 ± 0.010	11.80 ± 0.48
TLCA	0.552 ± 0.013	0.998 ± 0.002	0.007 ± 0.001	10.60 ± 0.25
GCA	2.136 ± 0.087	0.996 ± 0.003	0.016 ± 0.001	12.03 ± 0.50
GDCA	1.902 ± 0.101	0.997 ± 0.002	0.046 ± 0.002	14.66 ± 0.74

R²: Regressionskoeffizient, S_V: Verfahrensstandardabweichung, C_V: Verfahrensvariationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

o Zusammenfassung

Die Ergebnisse der visuellen Kontrolle, der linearen Regression sowie des Anpassungstest nach MANDEL und der Residualanalyse bestätigen, dass die Kalibrierfunktionen im untersuchten Konzentrationsbereich als linear angesehen werden können. Zudem konnte ein hohes Maß an Linearität über einen weiten, dynamischen Arbeitsbereich (50- bis 4500-fach) für alle Analyten aufgezeigt werden.

1.3.1.2 Matrixkalibrierung

Bei realen Proben kommt es oftmals zu einer Abweichung des Analysenwertes vom wahren Probenwert (Methodenlinearität). Um die Fragestellung zu verifizieren, ob die entwickelte Prüfmethode auch unter Bedingungen einer komplexen Matrix (Plasma, Fäzes, Fettgewebe und Zellkulturnährmedium) zuverlässige und präzise Ergebnisse liefert, wurde mit Hilfe einer Matrixkalibrierung der Einfluss von Matrixbestandteilen untersucht (vgl. Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.2). Analog zur Grundkalibrierung wurden zunächst eine lineare Regression sowie eine Residuenanalyse durchgeführt und gegebenenfalls visualisierte Ausreißer eliminiert (vgl. Abbildung D-14, Beispiel CA).

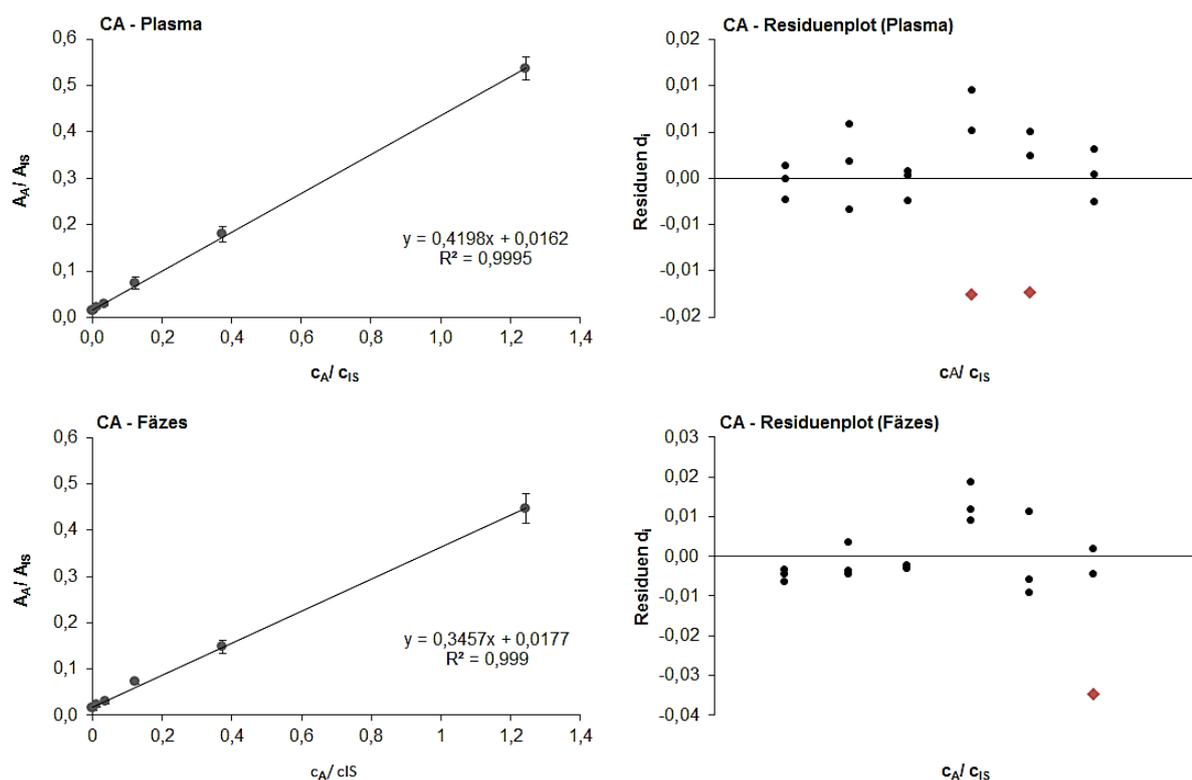


ABBILDUNG D-14 Regressionsgerade und Residuenplot der Gallensäure CA für die Matrices Plasma und Fäzes. Graphisch dargestellt sind die Kalibrierfunktionen 1. Grades (lineare Regression). Aufgetragen sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung je Messpunkt ($n = 3$). Die Ausreißer im Residuenplot sind rot markiert.

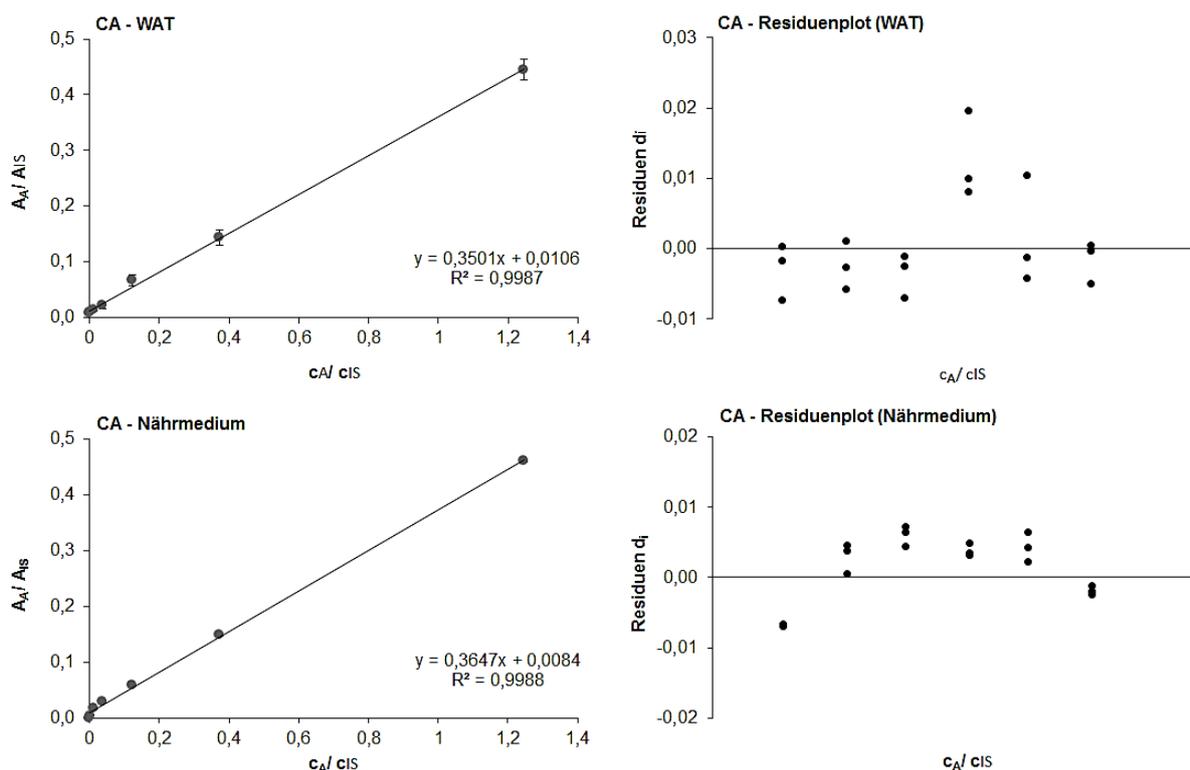


Abbildung D-15 Regressionsgerade und Residuenplot der Gallensäure CA für die Matrices Fettgewebe und Nährmedium. Graphisch dargestellt sind die Kalibrierfunktionen 1. Grades (lineare Regression). Aufgetragen sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung je Messpunkt ($n = 3$).

Die Regressionskoeffizienten R^2 entsprachen weitgehend denen aus der Grundkalibrierung. Es konnten durchweg akzeptable Ergebnisse mit $R^2 > 0.990$ erzielt werden (vgl. Teil I – Anhang Nr. 2 Tabellen I-6 bis I-9).

Im Vergleich zur Grundkalibrierung wies die Matrixkalibrierung deutlich niedrigere Empfindlichkeiten m auf. In besonderem Maße kann die Abnahme der Empfindlichkeiten bzw. der gemessenen Intensitäten durch den Effekt der Ionensuppression auftreten. Die erhaltenen Verfahrensvariationskoeffizienten C_V lagen, wie nach Maßgabe der FDA empfohlen, unter dem akzeptablen Grenzwert von 15%. In Tabelle D-4 sind die Regressionsparameter sowie die Bestimmungsgrenze (LLoQ, *Lower Limit of Quantitation*) für alle verwendeten Matrices, beispielhaft für acht repräsentative Gallensäuren dargestellt.

o Zusammenfassung

Abschließend kann gesagt werden, dass es gelungen ist eine spezifische und empfindliche LC-ESI-MS/MS-Methode für die Analyse von Gallensäuren zu entwickeln, welche auch unter den Bedingungen einer anspruchsvollen Matrix (Plasma, Fäzes, WAT und Zellkulturnährmedium) akzeptable Verfahrenskenndaten aufweist.

TABELLE D-4 Prüfung der Linearität der LC-MS/MS-Methode für die Matrixkalibrierung für die Matrices Plasma, Fäzes, Fettgewebe und Zellkulturnährmedium (Auszug). Dargestellt sind die Parameter (nach Eliminierung der Ausreißer), die zur Beurteilung der Qualität der Linearität durch lineare Regression erforderlich sind.

	LLOQ [μM]	Lineare Regression (n = 3)			
		Steigung m (MW \pm SD)	R ² (MW \pm SD)	S _v [μM] (MW \pm SD)	C _v [%] (MW \pm SD)
Plasma					
CA	0.036	0.420 \pm 0.022	0.999 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001	5.92 \pm 0.43
DCA	0.064	0.978 \pm 0.046	0.997 \pm 0.003	0.035 \pm 0.002	14.56 \pm 0.68
12-KDCA	0.115	0.116 \pm 0.007	0.998 \pm 0.001	0.035 \pm 0.002	13.91 \pm 0.81
DHCA	0.037	0.243 \pm 0.015	0.999 \pm 0.001	0.034 \pm 0.002	13.77 \pm 0.89
TCA	0.209	0.143 \pm 0.009	0.999 \pm 0.001	0.202 \pm 0.013	13.73 \pm 0.85
TLCA	0.029	0.461 \pm 0.059	0.999 \pm 0.001	0.010 \pm 0.001	10.61 \pm 1.57
GCA	0.056	0.753 \pm 0.024	0.998 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.58 \pm 0.33
GDCA	0.083	0.929 \pm 0.253	0.992 \pm 0.011	0.033 \pm 0.007	14.13 \pm 2.94
Fäzes					
CA	0.119	0.346 \pm 0.010	0.999 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.23 \pm 0.32
DCA	0.255	0.745 \pm 0.035	0.999 \pm 0.001	0.035 \pm 0.002	14.71 \pm 0.70
12-KDCA	0.156	0.120 \pm 0.005	0.996 \pm 0.001	0.036 \pm 0.001	14.46 \pm 0.58
DHCA	0.039	0.230 \pm 0.008	0.999 \pm 0.000	0.021 \pm 0.001	8.31 \pm 0.28
TCA	1.446	0.093 \pm 0.008	0.998 \pm 0.001	0.358 \pm 0.030	8.72 \pm 0.74
TLCA	0.039	0.513 \pm 0.029	0.997 \pm 0.003	0.011 \pm 0.001	12.23 \pm 0.71
GCA	0.046	0.846 \pm 0.067	0.998 \pm 0.001	0.019 \pm 0.001	7.71 \pm 0.56
GDCA	0.096	0.795 \pm 0.019	0.997 \pm 0.003	0.024 \pm 0.001	10.14 \pm 0.24
Fettgewebe					
CA	0.103	0.350 \pm 0.014	0.999 \pm 0.002	0.033 \pm 0.001	13.01 \pm 0.54
DCA	0.061	0.806 \pm 0.037	0.999 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001	11.35 \pm 0.52
12-KDCA	0.074	0.139 \pm 0.005	0.999 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.53 \pm 0.39
DHCA	0.018	0.242 \pm 0.001	0.999 \pm 0.000	0.006 \pm 0.000	2.36 \pm 0.01
TCA	1.349	0.096 \pm 0.007	0.996 \pm 0.003	0.160 \pm 0.010	10.88 \pm 0.71
TLCA	0.009	0.912 \pm 0.048	0.998 \pm 0.003	0.002 \pm 0.000	7.04 \pm 0.31
GCA	0.195	0.919 \pm 0.087	0.997 \pm 0.001	0.035 \pm 0.004	13.95 \pm 1.78
GDCA	0.214	0.809 \pm 0.025	0.994 \pm 0.004	0.030 \pm 0.001	12.78 \pm 0.38
Nährmedium					
CA	0.092	0.365 \pm 0.002	0.999 \pm 0.001	0.018 \pm 0.001	6.87 \pm 0.13
DCA	0.032	4.044 \pm 0.228	0.998 \pm 0.001	0.008 \pm 0.000	8.79 \pm 0.28
12-KDCA	0.064	0.124 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.019 \pm 0.001	7.52 \pm 0.13
DHCA	0.038	0.183 \pm 0.008	0.999 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001	5.28 \pm 0.15
TCA	1.642	0.132 \pm 0.007	0.998 \pm 0.001	0.378 \pm 0.005	9.21 \pm 0.13
TLCA	0.022	0.201 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.006 \pm 0.000	6.53 \pm 0.13
GCA	0.042	0.931 \pm 0.039	0.999 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001	5.54 \pm 0.22
GDCA	0.077	0.706 \pm 0.014	0.999 \pm 0.001	0.017 \pm 0.001	7.17 \pm 0.53

LLOQ: Bestimmungsgrenze, R²: Regressionskoeffizient, S_v: Verfahrensstandardabweichung, C_v: Verfahrensvariationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Abschnitt 1.4.2.3)

1.3.2 Präzision

Die Präzision stellt ein Maß für die Streuung von Messergebnissen dar, welches die Konformität von unabhängigen Analyseergebnissen untereinander zum Ausdruck bringt. Um das Präzisionsmaß von erhaltenen Analyseergebnissen bestimmen zu können, erfolgte die Überprüfung der Präzision der Methode, die in Form des C_V 's ausgedrückt wurde. Dabei wurden sowohl die Wiederholungs- und die Vergleichspräzision (vgl. Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.3) untersucht.

1.3.2.1 Wiederholungspräzision

Die Wiederholungspräzision (*Intra-Day Precision*) gibt die Präzision unter Wiederholbedingungen (WD) an, bei der voneinander unabhängige Ergebnisse in kurzen, sich wiederholenden Zeitabständen bei gleichbleibenden Messbedingungen wiederholt werden. Im Rahmen der Methodenvalidierung wurde die Wiederholungspräzision durch Mehrfachbestimmung von Proben ($n = 5$) bei drei verschiedenen Konzentrationslevels (QC 1 bis 3, *Quality Control*) mit unabhängigen Einwaagen ermittelt.

Nach Vorgaben der FDA sollte die Präzision C_V keine Werte $> 15\%$ annehmen²¹⁷. Die Ergebnisse in Tabelle D-5 (beispielhaft für CA, DCA, 12-KDCA, DHCA, TCA, TLCA und GDCA für die Matrix Plasma) zeigen, dass die Wiederholungspräzision für die entwickelte LC-MS/MS-Methode für den untersuchten Konzentrationsbereich gegeben ist. Es wurde für alle Analyten akzeptable C_V 's kleiner 10% ermittelt.

Die geringe Streuung der Messergebnisse unter Wiederholungsbedingungen konnte gezeigt werden. Des Weiteren unterschieden sich die Varianzen zwischen den Messwerten der Proben nicht signifikant voneinander (bestimmt mittels F-Test bei $P = 0.01$, $f_1 = f_2 = n - 1$).

1.3.2.2 Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision (*Inter-Day Precision*) gibt die Präzision C_V unter Vergleichsbedingungen (VGL) an, bei der voneinander unabhängige Ergebnisse am identischen Untersuchungsobjekt, aber an verschiedenen Tagen bzw. Messpunkten erhalten werden.

Für die LC-MS/MS-Multimethode sind die Vergleichspräzision in Tabelle D-5 aufgeführt. Erwartungsgemäß ergaben sich höhere C_V im Vergleich zum Testansatz der Wiederholungspräzision. Dennoch wurden akzeptable Werte von $C_V < 15\%$ erreicht, was aufzeigt, dass die Vergleichspräzision für den untersuchten Konzentrationsbereich gegeben ist.

Die Varianzen zwischen den Messwerten der Proben sind homogen verteilt (bestimmt mittels F-Test bei $P = 0.01$, $f_1 = f_2 = n - 1$), womit die Streuung der erhaltenen Analysendaten im untersuchten Bereich unter Vergleichsbedingungen unabhängig von der Analytkonzentration ist.

1.3.3 Genauigkeit

Die Genauigkeit ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom richtigen Wert aufgrund eines systematischen Fehlers. Die Genauigkeit wurde durch Bestimmung des relativen Fehlers (RE, *Relative Error*) auf unterschiedlichen Konzentrationsniveaus ermittelt. Hierfür wurden die Matrixproben mit dem Multistandard versetzt und der RE, nach Abzug der endogenen Gallensäurekonzentration bestimmt (vgl. Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.4 Gleichung (12)).

TABELLE D-5 Präzision und Genauigkeit unter Wiederholungs- (WD) und Vergleichsbedingungen (VGL) beispielhaft für die Matrix Plasma (Auszug). Die vollständige Übersicht für die Matrix Plasma kann dem Teil I – Anhang Nr. 2 Tabelle I-10 entnommen werden.

	QC-Konzentration [µM]	Präzision		Genauigkeit		
		WD (n = 5) [%]	VGL (n = 9) [%]	WD (n = 5) RE [%]	VGL (n = 9) RE [%]	
CA	QC1	0.19	1.81	8.42	5.25	-5.30
	QC2	1.87	2.07	10.00	-0.62	-1.66
	QC3	6.23	2.11	8.29	1.95	0.63
DCA	QC1	0.18	1.66	2.11	3.90	-3.93
	QC2	1.75	5.51	7.07	-0.80	-3.34
	QC3	5.83	1.78	6.42	-3.87	-2.85
12-KDCA	QC1	0.18	8.65	2.69	9.68	-3.26
	QC2	1.82	5.74	8.64	-3.25	2.48
	QC3	6.06	4.47	6.08	2.10	0.74
DHCA	QC1	0.18	4.14	8.38	8.80	-1.40
	QC2	1.81	1.42	6.00	-3.36	-2.91
	QC3	6.04	4.97	4.05	1.93	-2.60
TCA	QC1	3.01	4.34	10.95	7.23	-1.95
	QC2	30.10	5.04	4.61	-2.96	2.11
	QC3	100.3	1.38	6.89	-2.09	2.60
TLCA	QC1	0.18	2.57	8.42	3.74	-3.34
	QC2	1.79	2.18	5.73	2.59	-0.46
	QC3	5.95	2.94	4.72	0.22	1.98
GDCA	QC1	0.17	6.11	2.27	-1.83	-0.75
	QC2	1.71	3.43	7.98	-1.26	-0.51
	QC3	5.69	4.67	7.69	-0.74	-1.75

QC: Quality Control Sample, Cv: Verfahrensvariationskoeffizient, RE: Relative Error (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.4)

Der Mittelwert sollte gemäß den Maßgaben der FDA nicht mehr als 15% vom tatsächlichen Wert abweichen, außer im Bereich der Bestimmungsgrenze (LLoQ) wo eine Diskrepanz vom theoretischen Wert von 20% annehmbar ist²¹⁷. Die Genauigkeit der Methode entspricht den Anforderungen der FDA. Die relativen Fehler RE streuen um den Wert Null. Anhand der in Tabelle D-5 aufgeführten berechneten RE-Werte für den Probensatz der Kalibrierung erkennt man das Vermögen der Methode eine hohe Genauigkeit über den betrachteten Konzentrationsbereich zu garantieren. Da der RE-Wert bei der quantitativen Analyse von der Konzentration abhängig ist, konnte festgestellt werden, dass der Wert für RE mit steigendem Konzentrationsniveau kleinere Werte annahm.

1.3.4 Wiederfindung

Siehe Teil D – Ergebnisse und Diskussion Nr. 1.2.2.

1.3.5 Analytische Grenzwerte

Die Nachweisgrenze x_{NWG} (LLoD, *Lower Limit of Detection*) ist die kleinste Menge des Analyten in der Probe, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 50% erfasst werden kann. Die Bestimmungsgrenze x_{BG} (= LLoQ) repräsentiert hingegen die geringste quantifizierbare Konzentration einer Substanz in einer Probe, die mit einer gegebenen Präzision und Genauigkeit ermittelt werden kann.

Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte anhand der nach DIN 32654 beschriebenen Kalibriergeradenmethode²¹⁸ (vgl. Gleichung (13) und (14), Teil G – Material und Methoden, Nr. 1.4.6). Die Ergebnisse liegen in einem sehr guten Bereich und sind mit den Werten aus der Literatur vergleichbar^{195,199}. Die LLoQs der Analysenmethode, bestimmt für die Plasma, Fäzes, Fettgewebe und Zellkulturnährmedium sind im Teil I – Anhang Nr. 2 Tabelle I-6 bis I-9 angegeben.

2 Untersuchungen zum Einfluss von *Coriobacteriaceae* auf den Gallensäuren- und Lipidmetabolismus

2.1 *In vitro*-Fermentation

Im Dickdarm werden Gallensäuren durch die Darmmikrobiota transformiert, was zu einer großen Vielfalt von in Metaboliten führt, die sich ihren physikochemischen und biochemischen Eigenschaften unterscheiden. Einige Mitglieder der Familie *Coriobacteriaceae* haben nachweislich das Potenzial, den Wirtsstoffwechsel z.B. die Cholesterolsynthese- und -absorption zu modulieren²¹⁹, allerdings sind die Interaktionen mit dem Wirtsorganismus und der Einfluss auf die Entstehung von stoffwechselassoziierten Erkrankungen bisher unbekannt^{11,24} (vgl. Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 1.2).

Daher wurde im ersten Schritt, das Potenzial der vier *Coriobacteriaceae*-Stämme (*E. mucosicola*, *C. aerofaciens*, *Egg. lenta* und *A. parvulum*) Einfluss auf die bakterielle Gallensäure-Transformation zu nehmen, in einem *in vitro*-Testsystem untersucht.

2.1.1 BSH-Aktivität

Der erste Schritt in der mikrobiellen Transformation von konjugierten Gallensäuren stellt die Hydrolyse der Amidbindung an C-24 des Sterankörpers durch die Aktivität des Enzyms BSH unter Freisetzung unkonjugierter Gallensäuren dar. Aufgrund von sterischen Hindernissen können erst nach Abspaltung der Aminosäure weitere Umwandlungsreaktionen wie bspw. eine Dehydroxylierung durch die Darmmikroben erfolgen (siehe Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 2.4).

In silico-Analysen zeigen, dass *E. mucosicola* und *C. aerofaciens* über das Enzym BSH verfügen. Hierbei wurde das bekannte Genom in eine Proteinsequenz übersetzt und mit der theoretischen Proteinsequenz von BSH verglichen.

Der bioanalytische Nachweis, ob die vier Stämme aus der Familie *Coriobacteriaceae* eine BSH-Aktivität aufweisen, wurde anhand der reduzierten Konzentrationen der konjugierten Gallensalze TCA und GCA, die als Substrate verwendet wurden, und der Menge an CA, welche in das Fermentationsmedium freigesetzt wurde, abgeschätzt.

Neben den Spezies *E. mucosicola* und *C. aerofaciens* zeigte ebenfalls *Egg. lenta* die Fähigkeit auf, Gallensäuren zu dekonjugieren. Die Konzentrationen der konjugierten Gallensäuren TCA und GCA waren nach 48 h um je 24% bzw. 18% reduziert, wohingegen die Menge an freiem CA signifikant gesteigert war (siehe Tabelle D-6). Im Allgemeinen weist *C. aerofaciens* im Vergleich zu Spezies *E. mucosicola* und *Egg. lenta* bessere Dekonjugation-Eigenschaften gegenüber TCA und GCA auf. Die beiden letztgenannten Spezies hydrolysieren sowohl das Taurin- als auch das Glycinkonjugat mit gleicher Effizienz, wohingegen die BSH aus *C. aerofaciens* unter den verwendeten Fermentationsbedingungen eine höhere Affinität für Glycinkonjugierte Gallensäuren aufwies. Der vierte Stamm des selektierten *Coriobacteriaceae*-Konsortiums, *A. parvulum*, war im durchgeführten Experiment nicht in der Lage die Amidbindung der konjugierten Gallensäuren zu hydrolysieren.

TABELLE D-6 Dekonjugation von Gallensäuren durch ausgewählte Stämme der Familie *Coriobacteriaceae* unter *in vitro*-Bedingungen. (MW ± SD)

	BSH-Aktivität (n = 3)					
	TCA [mM]		GCA [mM]		CA [mM]	
	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
Negativkontrolle ^a	0.97 ± 0.07	0.93 ± 0.13	1.14 ± 0.03	1.02 ± 0.02	0.042 ± 0.008	0.040 ± 0.002
Positivkontrolle ^a	0.96 ± 0.09	n/a ^{***}	1.00 ± 0.02	n/a ^{***}	0.040 ± 0.004	1.10 ± 0.15 ^{**}
<i>C. aerofaciens</i> (DSM 3979 ^T)	0.92 ± 0.09	0.36 ± 0.02 ^{**}	1.04 ± 0.04	0.017 ± 0.003 ^{***}	0.038 ± 0.001	0.38 ± 0.05 ^{**}
<i>Egg. lenta</i> (DSM 2243 ^T)	0.89 ± 0.12	0.62 ± 0.08 [*]	1.02 ± 0.08	0.75 ± 0.05	0.029 ± 0.002	0.23 ± 0.01 ^{**}
<i>A. parvulum</i> (DSM 20469 ^T)	0.82 ± 0.12	0.79 ± 0.10	1.07 ± 0.11	0.87 ± 0.12	0.028 ± 0.006	0.025 ± 0.002
<i>E. mucosicola</i> (DSM 19490 ^T)	0.85 ± 0.04	0.65 ± 0.01	1.16 ± 0.09	0.95 ± 0.03 [*]	0.028 ± 0.002	0.11 ± 0.00 ^{***}

^a Negativkontrolle: keine Supplementation, Positivkontrolle: Mausfäzes (1:50 verdünnt mit Nährmedium)

* Gallensäuren innerhalb einer Substanz sind signifikant unterschiedlich mit $P < 0.05$

** Gallensäuren innerhalb einer Substanz sind signifikant unterschiedlich mit $P < 0.01$

*** Gallensäuren innerhalb einer Substanz sind signifikant unterschiedlich mit $P < 0.001$

n/a not available

2.1.2 HSDH- und 7 α -Dehydroxylase-Aktivität

Zusätzlich zur BSH exprimieren verschiedene Darm-Bakterienspezies **HSDH**-Enzyme, die eine stereospezifische Oxidation von Hydroxylgruppen an C-3, C-7 und C-12 unter Formation stabiler Oxo-Intermediate katalysieren, wobei die Keto-Gruppen wiederum in stereospezifische α - bzw. β -Hydroxylgruppen umgewandelt werden können (siehe Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 2.4)^{220,221}. Die Aktivität einer HSDH stellt wahrscheinlich einen Schutzfaktor intestinaler Bakterien vor toxischen Gallensalzen dar, indem durch die Transformation die Konzentration des hydrophoben Substrats gesenkt wird⁷⁷.

TABELLE D-7 Bildung der Oxo-Gallensäuren 3-KDCA und 12-KDCA durch Stämme der *Coriobacteriaceae* unter *in vitro*-Bedingungen. (MW ± SD)

	HSDH-Aktivität (n = 3)			
	3-KDCA [μ M]		12-KDCA [μ M]	
	0 h	48 h	0 h	48 h
Negativkontrolle ^a	n/a	n/a	n/a	n/a
Positivkontrolle ^a	0.97 ± 0.06	13.7 ± 1.43 ^{**}	0.029 ± 0.003	8.66 ± 1.58 [*]
<i>C. aerofaciens</i> (DSM 3979 ^T)	n/a	1.04 ± 0.15 ^{***}	n/a	2.07 ± 0.12 ^{***}
<i>Egg. lenta</i> (DSM 2243 ^T)	n/a	2.26 ± 0.16 ^{***}	n/a	5.33 ± 0.56 ^{***}
<i>A. parvulum</i> (DSM 20469 ^T)	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>E. mucosicola</i> (DSM 19490 ^T)	n/a	0.20 ± 0.05 ^{***}	n/a	7.01 ± 1.48 ^{***}

^a Negativkontrolle: keine Supplementation, Positivkontrolle: Mausfäzes (1:50 verdünnt mit Nährmedium)

* Gallensäuren innerhalb einer Substanz sind signifikant unterschiedlich mit $P < 0.05$

** Gallensäuren innerhalb einer Substanz sind signifikant unterschiedlich mit $P < 0.01$

*** Gallensäuren innerhalb einer Substanz sind signifikant unterschiedlich mit $P < 0.001$

n/a not available

Aus Daten der Literatur war bereits bekannt, dass die zwei Stämme *Egg. lenta* und *C. aerofaciens* des *Coriobacteriaceae*-Konsortiums in der Lage sind freie, primäre Gallensäuren zu dehydrieren. *Egg. lenta* verfügt über drei HSDH-Enzyme (3 α / β - und 12 α -HSDH). *C. aerofaciens* ist durch die Expression einer 7 β -HSDH charakterisiert⁷⁷.

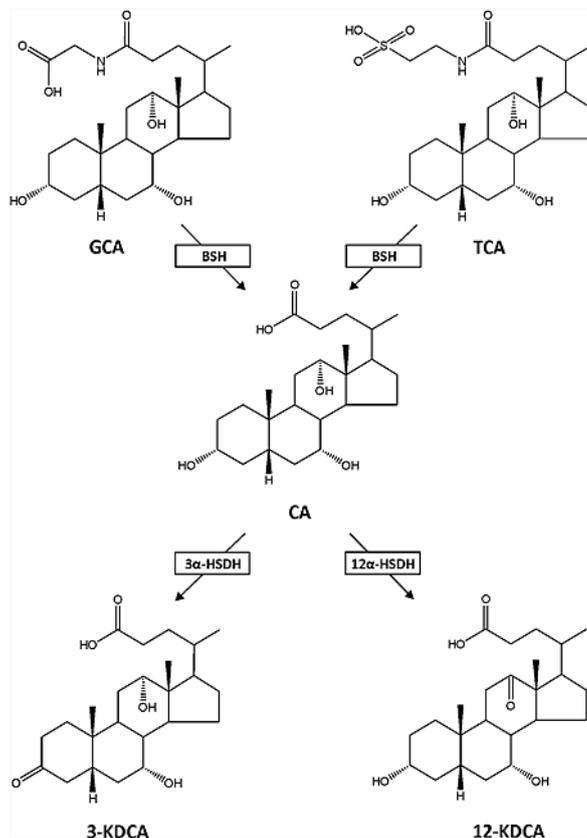


ABBILDUNG D-16 Bakterielle Transformation von konjugierten Gallensäuren durch Vertreter der Familie *Coriobacteriaceae* am Beispiel einer 3 α - und 12 α -Dehydrierung von CA nach Dekonjugation von TCA und GCA durch das Enzym BSH.

Im vorliegenden Fermentationsexperiment konnte gezeigt werden, dass *E. mucosicola*, *C. aerofaciens* und *Egg. lenta* über die Fähigkeit verfügen, unter den verwendeten Anzuchtbedingungen, die freie Gallensäure CA aus den konjugierten Spezies TCA und GCA zu bilden. CA ist eine Trihydroxygallensäure, die α -Hydroxylgruppen an Position C-3, C-7 und C-12 aufweist. Durch Dehydrierung an C-3 wird 3-KDCA (3-Ketodeoxycholic Acid) gebildet. Erfolgt eine Oxidation der Hydroxylgruppe an C-12 entsteht aus CA die Oxogallensäure 12-KDCA (12-Ketodeoxycholic Acid).

Aufgrund des Potenzials von *Egg. lenta* α -Hydroxylgruppen am C-3 und C-12 zu dehydrieren, konnten erwartungsgemäß nach 48 h die Metabolite 3- und 12-KDCA nachgewiesen werden, wobei die Dehydrierung am C-12 des Steran-Körpers verstärkt erfolgte (vgl. Tabelle D-7 und Abbildung D-16). Die gesteigerte Bildung von 12-KDCA im Vergleich zu 3-KDCA konnte ebenfalls als Charakteristikum von *E. mucosicola* im vorliegenden Fermentationsexperiment beschrieben werden. Somit wurde das erste Mal gezeigt, dass *E. mucosicola* die Eigenschaften aufweist, Gallensäuren sowohl zu dekonjugieren (BSH-Aktivität, siehe 2.1.1) als auch zu dehydrieren (Aktivität einer 3 α - und 12 α -HSDH).

Ebenfalls wurde im Testansatz von *C. aerofaciens* nach 48 h eine signifikante Zunahme der Konzentration an 3- und 12-KDCA identifiziert. Neben der postulierten Aktivität einer 7 β -HSDH lassen die Ergebnisse der vorliegenden *in vitro*-Teststudie unter den gegebenen Bedingungen ferner auf die Expression weiterer Enzyme aus der Klasse der Oxidoreduktasen, namentlich 3 α - und 12 α -HSDH, schließen.

Die bedeutsamste und quantitativ wichtigste mikrobielle Gallensäuretransformation stellt die **Dehydroxylierung** der 7 α -Hydroxylgruppe am Steroidnukleus primärer Gallensäuren (CA und CDCA) unter Generierung der sekundär Metabolite DCA und LCA dar (vgl. Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 2.4).

Gemäß dem aktuellen Kenntnisstand, wird in der Literatur für keinen der *Coriobacteriaceae*-Stämme die Expression einer 7 α -Hydroxylase beschrieben. Im Einklang mit den Daten der Literatur konnte im Rahmen der *in vitro*-Fermentation keine Bildung von sekundären Gallensäuren beobachtet werden.

2.2 In vivo-Fütterungsstudie

Durch *in vitro*-Testsysteme lassen sich zwar einfache bis komplexe physiologische und biochemische Reaktionen repräsentieren, allerdings bleiben systemische und organspezifische Einflüsse unberücksichtigt. Aufgrund der Komplexität und Diversität der Darmmikrobiota ist es oftmals schwer nachvollziehbar, welche physiologischen und biochemischen Prozesse von bestimmten Bakterienstämmen ausgeübt werden. Der gnotobiotische Ansatz bietet die Möglichkeit keimfreie Mäuse mit einzelnen Bakterienspezies zu kolonisieren, um gezielt Erkenntnisse über deren Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase sowie Informationen über die Interaktion zwischen intestinalen Bakterien und dem Wirt zu erhalten.

Die Analytik zur Bestimmung der Gallensäuren in Plasma-, Ceacum- und Fettgewebeproben wurde mittels der entwickelten LC-MS/MS-Methode durchgeführt (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 2.2.3). Zudem erfolgte eine gaschromatographische Quantifizierung der freien Fettsäuren im Fettgewebe (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 2.2.4).

2.2.1 Hintergrund und Ziel der Studie

Die intestinale Mikrobiota weist mit 10^{10} bis 10^{12} Bakterienzellen je Gramm Darminhalt die höchste Besiedlungsdichte im Colon auf und stellt ein komplexes Ökosystem dar. Zwischen den Bakterien und dem Wirtsorganismus bestehen enge Wechselwirkungen. Durch protektive und metabolische Funktionen kommt der intestinalen Mikrobiota und ihren Stoffwechselprodukten eine große Bedeutung für die Gesundheit des Menschen zu (vgl. Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 1.1). *Coriobacteriaceae* stellen dominante Besiedler des humanen und tierischen Gastrointestinaltraktes dar. Ihnen werden wichtige Rollen im Lipidstoffwechsel sowie bei der Prävalenz zahlreicher Erkrankungen zugeschrieben. Durch die Transformation von Gallensäuren wirken sie auf deren Metabolismus ein und üben somit möglicherweise einen Einfluss auf den Wirtsorganismus aus. Fehlregulationen des Gallensäure- und Lipidstoffwechsels sind u.a. assoziiert mit der Entstehung des metabolischen Syndroms, aber auch mit Lebererkrankungen wie NAFLD (vgl. Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 1.1).

Ziel der Studie war es, den Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf den Gallensäure- und Lipidstoffwechsel *in vivo* zu bewerten (vgl. Teil C – Problemstellung und Zielsetzung). Da die Ernährung des Wirtes – neben direkten ernährungsphysiologischen Resultaten – maßgeblich einen Effekt auf die Diversität und Funktion der Darmmikrobiota hat, war es ebenfalls von Interesse, die Auswirkung von Nahrungsbestandteilen auf die metabolische Aktivität der *Coriobacteriaceae* zu untersuchen.

2.2.2 Studiendesign

Männliche, keimfreie C57BL/6N Mäuse wurden 5 Wochen nach der Geburt mit 4 dominanten *Coriobacteriaceae*-Stämmen ('*Corio*') besiedelt. Nach weiteren 5 Wochen erfolgte eine randomisierte Einteilung in drei Gruppen (n = 12). Um die Regulation des Gallensäurestoffwechsels besser zu untersuchen zu können, eignet sich die Anreicherung der Nahrung mit Gallensäuren. Fortan wurden die Mausgruppen mit unterschiedlichen Diäten (Kontrolldiät (CD, *Control Diet*), Palmölbasierte-fetteiche Diät (HFD, *High Fat Diet*) und einer mit den Gallensäuren CA (0.1%, w/w) und CDCA (0.1%, w/w) supplementierten Kontrolldiät (BA, *Bile Acid Diet*) für 16 Wochen gefüttert wurden (je Fütterungsgruppe n = 12).

Keimfreie (GF, *Germfree*) sowie spezifisch pathogen-freie (SPF) Mäuse dienten als Kontrolle. Die Keimfreiheit der Mäuse sowie der Erfolg der Kolonisierung wurden mit Hilfe von Kultivierung sowie einer 16S rRNA-Sequenzierung überprüft. Nach Ablauf der 26. Lebenswoche erfolgte die Probenahme (siehe Studiendesign, Teil G – Material und Methoden Nr. 2.2.2).

Das Tierexperiment wurde am ZIEL – Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung der Technischen Universität München durchgeführt.

2.2.3 Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf den metabolischen Status vom WAT

2.2.3.1 Makroskopische und Morphologische Veränderungen

Ein erhöhtes Körpergewicht gilt für eines der wichtigsten Ursachen für die Ätiologie von metabolischen Erkrankungen wie Typ-2 Diabetes mellitus, Insulinresistenz und kardiovaskulären Komplikationen²²². Übergewicht ist die Folge einer positiven Energiebilanz zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrennung über einen längeren Zeitraum. Weiterhin fördert die Zusammensetzung der Nahrung, vor allem eine Ernährung die reich an Fetten ist, die Entstehung von Übergewicht.

Um den Einfluss der Ernährung auf die Entwicklung des Körpergewichts der C57BL/6N Mäuse zu studieren, wurde diese wöchentlich über den gesamten Zeitraum von 26 Wochen gewogen. Dabei zeigte sich, dass C57BL/6N Mäuse auf HFD – unabhängig vom Kolonisierungsstatus – bereits 3 Wochen (13. Lebenswoche) nach der Ernährungsumstellung ein um etwa 2 bis 6 g erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu CD- bzw. BA-gefütterten C57BL/6N Mäusen aufwiesen. Diese Diskrepanz im Körpergewicht nahm kontinuierlich über den gesamten Studienzeitraum zu. Final konnte eine Differenz im Körpergewicht zwischen HFD- und CD- bzw. BA-gefütterten Tieren von etwa 13 g ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu wurde zwischen den CD- und den BA-gefütterten Tieren – gleichgültig welchen Kolonisierungstyp sie angehörten – ab dem Beginn der diätetischen Intervention (Woche 10) kein signifikanter Gewichtsunterschied beobachtet.

Die Daten zeigen, dass eine fettreiche Ernährung (HFD) in einer deutlichen Gewichtszunahme (** $P < 0.001$, vergleichend zu CD und BA) resultierte (vgl. Abbildung D-17 A), wobei unabhängig von der Kolonisierung bei allen C57BL/6N Mäusen am Studienende eine Fettleber (Steatose) diagnostiziert wurde. Innerhalb der HFD-Fütterungsgruppe wiesen die SPF-assoziierten C57BL/6N Mäuse ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu den keimfreien und 'Corio'-C57BL/6N Mäusen auf (* $P < 0.05$, vergleichend zu 'Corio'; ** $P < 0.01$, vergleichend zu GF).

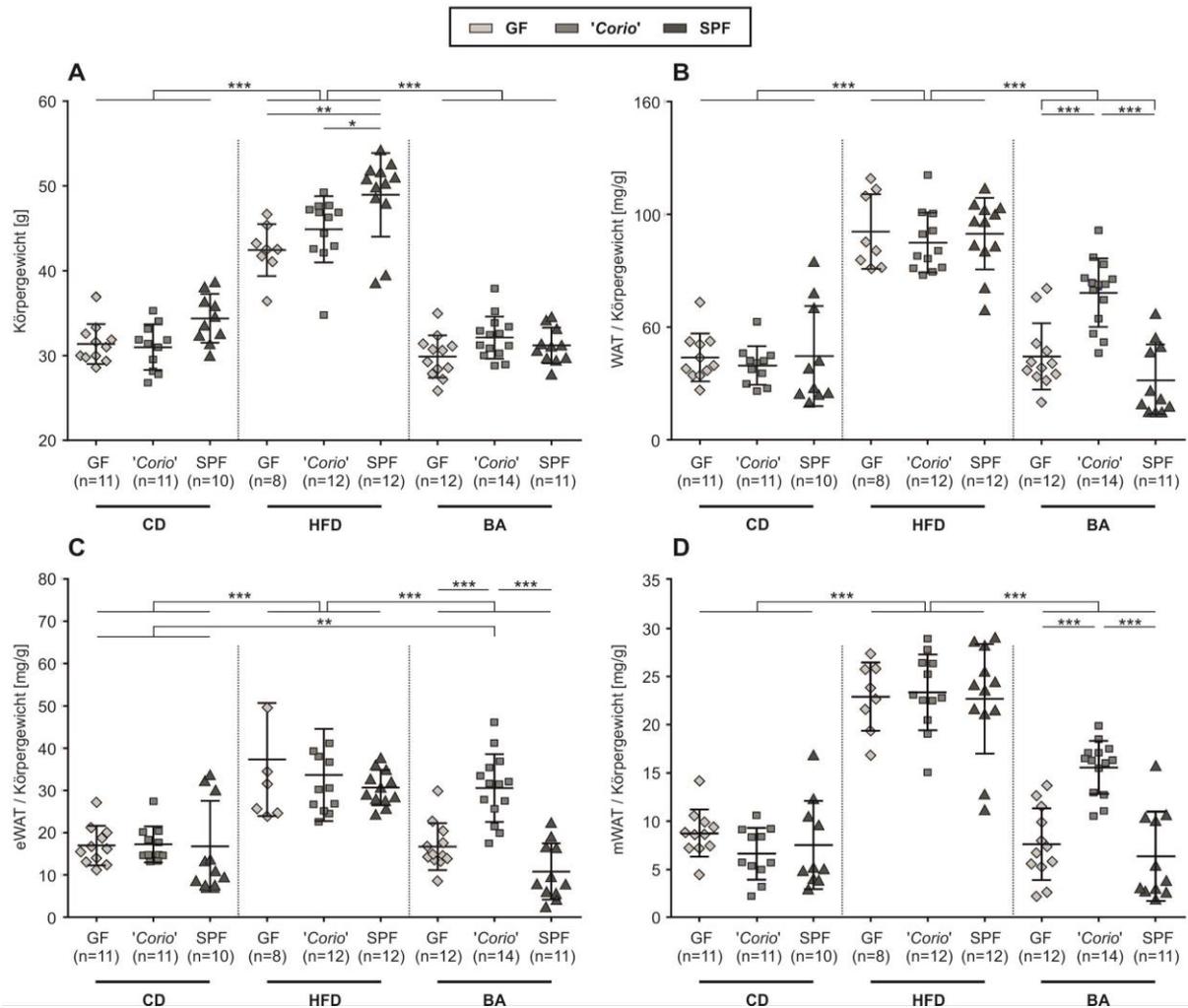


ABBILDUNG D-17 Körpergewicht und Fettgewebe-zu-Körpergewicht-Verhältnis (Studienende) der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) nach diätetischer Intervention. **A:** finales Körpergewicht der C57BL/6N-Versuchstiere (Lebensalter: 26 Wochen) nach Fütterung mit CD (65% Kohlenhydrate, 23% Fett, 18% Protein), HFD (34% Kohlenhydrate, 48% Fett, 18% Protein), BA (CD supplementiert mit 0.1% CA (*w/w*) und 0.1% CDCA (*w/w*)). **B:** Gesamtfettmasse der weißen Fettdepots in Relation zum Körpergewicht. **C & D:** Masse an eWAT (C) und mWAT (D) im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht (ausgedrückt in mg/g). Die Berechnung der signifikanten Unterschiede erfolgte mittels einer *Two-Way-ANOVA*. Die Methode nach *HOLM-SIDAK* wurde als Post-Hoc-Verfahren verwendet: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Die Daten wurden von Frau Sarah Just (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

Die Beobachtung, dass bei Nagern durch eine HFD Adipositas induziert werden kann, wurde vielfach gezeigt^{223,224}. *Post mortem* konnte für alle HFD-ernährten C57BL/6N Mäusen festgestellt werden, dass das Verhältnis von weißen Fettdepots (WAT, *White Adipose Tissue*) zum Körpergewicht, im Vergleich zu den Versuchstieren der beiden weiteren Diätgruppen, erhöht war (vgl. Abbildung D-17 B bis D). Interessanterweise konnte dieser makroskopische Effekt bei 'Corio'-assoziierten Versuchstieren (65 ± 15 mg/g Körpergewicht), die eine mit Gallensäuren supplementierte Diät (BA) erhielten, ebenfalls beobachtet werden (vgl. Abbildung E-17 B). Im Vergleich zu GF- (37 ± 15 mg/g Körpergewicht) und SPF-C57BL/6N Mäusen (26 ± 16 mg/g Körpergewicht) wurde eine Akkumulation an Gesamt-WAT um den Faktor 1.7 - 2.5 festgestellt. Dieser Effekt konnte sowohl im mesenterialen (mWAT), subkutanen (sWAT, Ergebnisse nicht graphisch in Abbildung D-17 dargestellt) und am deutlichsten im epididymalen weißen Fettgewebe (eWAT) der C57BL/6N Mäuse (***) $P < 0.001$, vergleichend zu GF und SPF) ausgemacht werden (vgl. Abbildung D-17 (C) und (D)).

Allgemein kann zwischen subkutanen und viszeralen (epididymal) Fettgewebe unterschieden werden, wobei das Mesenterium den viszeralen Fettdepots zuzuordnen ist. Eine viszerale Fettleibigkeit wird als kritische Determinante von adipositären Stoffwechselstörungen, welche zur Ätiologie von Insulinresistenz, Typ-2 Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen führen kann, angesehen²²⁵. Als Folge einer längerfristigen erhöhten Aufnahme an Nährstoffen kommt es zu morphologischen Veränderungen des Fettgewebes, die einerseits durch eine Erhöhung der Zellzahl an Adipozyten bei gleichbleibender Zellgröße (adipozytäre Hyperplasie) oder, infolge der vermehrten Einlagerung an Triacylglycerolen, durch eine Vergrößerung der vorhandenen Fettzellen (adipozytäre Hypertrophie) bedingt sind²²⁶.

Zur Bestimmung der Adipozytengröße wurden 5 μm dicke Fettgewebsschnitte nach dem Aushärten in Paraffin mittels der HE-Methode (Hämatoxylin-Eosin) angefärbt und mit Hilfe eines *Imaging*-Verfahrens die Flächen der Fettzellen exemplarisch für das eWAT und mWAT ermittelt (vgl. Abbildung D-18).

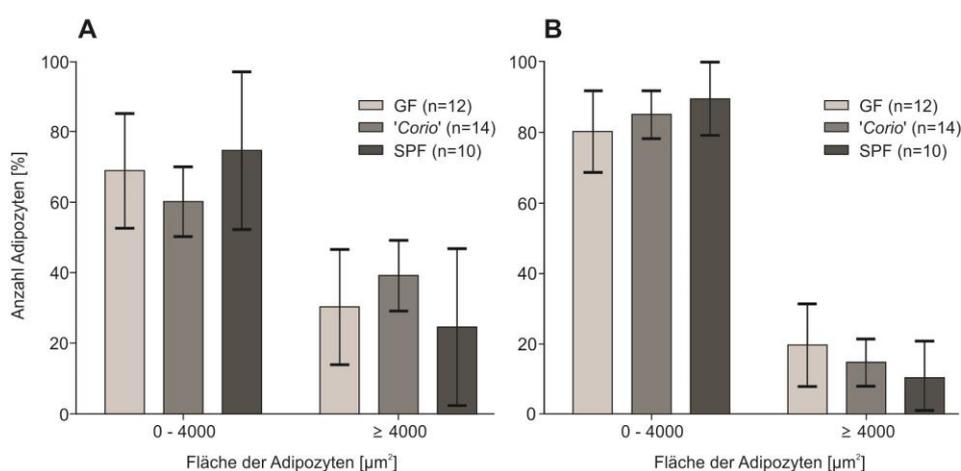


ABBILDUNG D-18 Prozentuale Anzahl der Adipozyten in der weißen Fettgewebsmasse der C57BL/6N Mäuse nach Fütterung mit BA. A: eWAT B: mWAT. Die Zunahme an Fettgewebsmasse in *Coriobacteriaceae*-assoziierten C57BL/6N Mäusen ist nicht auf die flächenmäßige Vergrößerung der vorhandenen Fettzellen zurückzuführen. Vielmehr scheint das überschüssige Wachstum der Fettdepots auf hyperplastischen Effekten zu beruhen.

Die Daten wurden von Frau Sarah Just (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

In 'Corio'- C57BL/6N Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Größe der Adipozyten vergleichend mit den Kontrolltieren (GF und SPF) festgestellt werden. Die Interaktion zwischen *Coriobacteriaceae* und dem Wirtsorganismus beeinflusst die Zusammensetzung des Fettgewebes durch eine Erhöhung der Zellzahl bei gleichbleibender Zellgröße (Hyperplasie) aber nicht durch Vergrößerung der vorhandenen Adipozyten (Hypertrophie). Hyperplastischen Fettzellen werden protektive Eigenschaften gegenüber Typ-2 Diabetes mellitus zugesprochen, wohingegen Hypertrophie mit hochgradig insulinresistenten Adipozyten assoziiert ist^{227,228}.

2.2.3.2 Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf den Lipidstoffwechsel im WAT

Nachdem lange Zeit die Hauptaufgabe des Fettgewebes auf die Funktion als Energiespeicher und Wärmeisolator reduziert wurde, wird dieses heute als eigenständiges endokrines Organ angesehen, das durch die Bildung und Sekretion einer Vielzahl von biologisch aktiven Stoffen (v.a. Peptidhormone und Zytokine), welche an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt sind, charakterisiert ist. Aus diesem Grund wirkt sich die übermäßige Zunahme von Fettdepots nicht nur auf das Körpergewicht auf, sondern bewirkt auch Veränderungen in physiologisch relevanten Stoffwechselwegen.

Das Wechselspiel aus anabolen und katabolen Vorgängen des Lipidstoffwechsels – der Lipogenese (Energiespeicherung) und der Lipolyse (Energiebereitstellung) – unterliegt einer strikten hormonellen Regulation. Welcher dieser beiden Vorgänge unter den sich wechselnden physiologischen Umständen bevorzugt stattfindet, hängt neben den Nahrungsgewohnheiten von hormonellen Einflüssen und dem Darmmikrobiom ab. In einer Publikation von LEY et al. (2006) wird die vermeintliche Rolle des intestinalen Mikrobioms bei der Regulation des Körpergewichts diskutiert⁵³. So weisen keimfreie Mäuse eine um 40% verringerte Fettgewebsmasse als normal-kolonisierte Mäuse auf⁵⁶, wobei eine Besiedlung mit der Darmmikrobiota adipöser Tiere zu einer Erhöhung der Gesamtfettmasse führte⁵⁸. Die zu Grunde liegenden physiologischen Zusammenhänge und Mechanismen der Kommunikation zwischen Darmmikroben und Fettgewebe sind jedoch noch unbekannt.

Das Auftreten von freien Fettsäuren (FFA, *Free Fatty Acids*) ist größtenteils durch die Lipolyse der in Form von Triacylglycerolen gespeicherten Fettsäuren aus dem Fettgewebe bedingt. Die Stärke der Lipolyse, speziell unter Nahrungskarenz, kann als ein Marker für die Insulinsensitivität angesehen werden²²⁹. Um Unterschiede im Lipidmetabolismus des Fettgewebes zwischen 'Corio'- C57BL/6N Mäusen und den C57BL/6N Kontrolltieren (GF, SPF) zu erkennen, wurde das Fettgewebe entnommen und die Zusammensetzung der FFA mittels GC-FID bestimmt. Die erhaltenen Fettsäureprofile für eWAT und mWAT sind der Abbildung D-19 zu entnehmen.

Auffällig ist die deutlich verringerte Gesamtkonzentration an FFA im Fettgewebe von *Coriobacteriaceae*-assoziierten C57BL/6N Mäusen im Vergleich zu den erzielten Spektren der GF- und SPF-Versuchstieren (vgl. Tabelle D-8). Statistisch essenzielle Unterschiede zum Fettsäureprofil der SPF-Tiere konnten vielfach aufgezeigt werden (vgl. Abbildung D-19). Ausschließlich im mWAT ließen sich signifikante Divergenzen im Vergleich zum Fettsäurespektrum der keimfreien C57BL/6N Mäuse im Konzentrationsprofil der gesättigten Fettsäure Laurin- (C12:0, ** $P < 0.01$), Myristin- (C14:0, ** $P < 0.01$), Palmitin- (C16:0, ** $P < 0.01$) und Stearinsäure (C18:0, ** $P < 0.01$) feststellen.

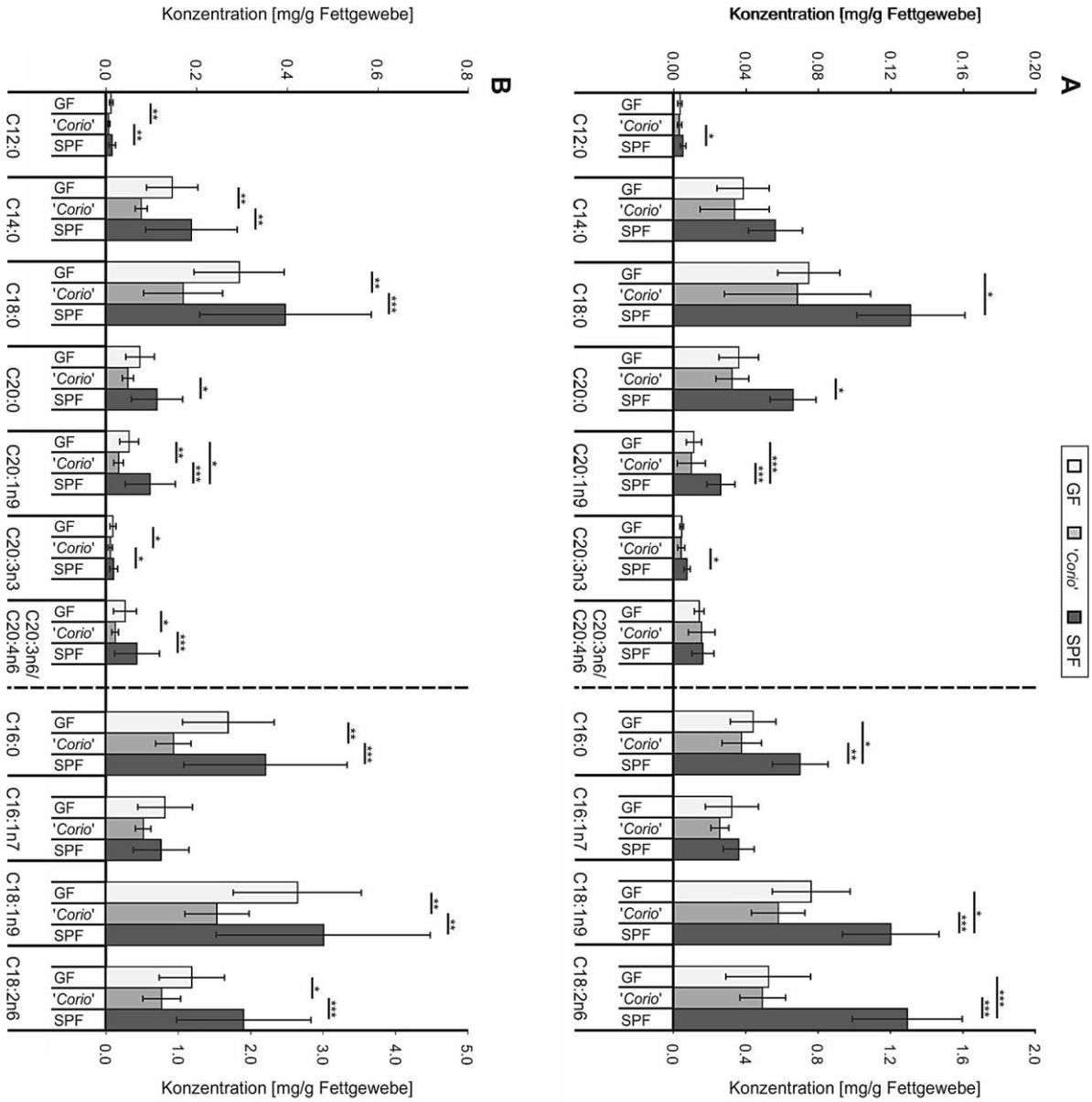


Abbildung D-19 Profil der freien Fettsäuren (FFA) im Fettgewebe (Studierende) der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) nach diätetischer Intervention. A: eWAT, B: mWAT. Die Berechnung der signifikanten Unterschiede erfolgte mittels einer Two-Way-ANOVA. Die Methode nach Holm-Sidak wurde als Post-Hoc-Verfahren verwendet: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$.**

- C12:0 - Laurinsäure
- C14:0 - Myristinsäure
- C16:0 - Palmitinsäure
- C16:1n7 - Palmitoleinsäure
- C18:0 - Stearinsäure
- C18:1n9 - Ölsäure
- C18:2n6 - Linolsäure
- C20:0 - Arachinsäure
- C20:1n9 - Gadoleinsäure
- C20:3n3 - Eicosatriensäure
- C20:3n6 - Dinomo- γ -Linolensäure
- C20:4n6 - Arachidonsäure

In Hinblick auf die einfach- und mehrfach-gesättigten Fettsäuren ist eine signifikante Abnahme der Gehalte an Öl- (C18:1n9, ** $P < 0.01$), Linol- (C18:2n6, * $P < 0.05$), Gadolein- (C20:1n9, ** $P < 0.01$), Eicosatrien- (C20:3n3, * $P < 0.05$) und dem Summenparameter aus Dihomo- γ -Linolen- und Arachidonsäure (C20:3n6/C20:4n6, * $P < 0.05$) nachweisbar, wobei auch hier die größten Veränderungen im mWAT ausgeprägt waren.

Das eine Zunahme an Fettgewebe mit der Abnahme der Fettsäuren C18:0 und C18:1n9 in Korrelation gebracht werden kann, ist ein bereits in der Literatur beschriebenes Phänomen²²⁵ und konnte in der vorliegende Studie am Beispiel der BA gefütterten 'Corio'-C57BL/6N Mäuse beobachtet werden. Zudem korrelieren geringe Konzentrationen an Arachinsäure (C20:0, $P > 0.05$, keine Signifikanz) ebenfalls positiv mit einer anwachsende Fettgewebsmasse. Des Weiteren waren die Produkte der $\Delta 9$ -Desaturase (z.B. C16:1n7 und C18:1n9) im Vergleich zu den ermittelten Werten im WAT von GF- und SPF-Tieren erniedrigt. Geringe Mengen an C16:0 und C16:1n7 sind wahrscheinlich mit einer Insulinresistenz assoziiert²²⁵.

TABELLE D-8 FFA-Profil im weißen Fettgewebe der BA-gefütterten C57BL/6N Mäuse am Studienende. Die signifikanten Unterschiede sind der Abbildung D-19 zu entnehmen. (MW \pm SD)

	GF (n = 8) [ng/mg WAT]	'Corio' (n = 10) [ng/mg WAT]	SPF (n = 9) [ng/mg WAT]
eWAT			
C12:0	0.004 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001	0.005 \pm 0.002
C14:0	0.038 \pm 0.015	0.034 \pm 0.020	0.056 \pm 0.016
C16:0	0.442 \pm 0.133	0.378 \pm 0.115	0.701 \pm 0.162
C16:1n7	0.324 \pm 0.155	0.258 \pm 0.051	0.363 \pm 0.089
C18:0	0.075 \pm 0.018	0.068 \pm 0.042	0.131 \pm 0.031
C18:1n9	0.762 \pm 0.229	0.579 \pm 0.155	1.202 \pm 0.281
C18:2n6	0.525 \pm 0.248	0.494 \pm 0.131	1.294 \pm 0.321
C20:0	0.036 \pm 0.012	0.033 \pm 0.009	0.066 \pm 0.013
C20:1n9	0.011 \pm 0.004	0.010 \pm 0.008	0.026 \pm 0.008
C20:3n3	0.005 \pm 0.001	0.004 \pm 0.002	0.008 \pm 0.002
C20:3n6/C20:4n6	0.014 \pm 0.003	0.016 \pm 0.007	0.016 \pm 0.006
Summe	2.235 \pm 0.819	1.876 \pm 0.544	3.868 \pm 0.931
	GF (n = 12) [ng/mg WAT]	'Corio' (n = 13) [ng/mg WAT]	SPF (n = 9) [ng/mg WAT]
mWAT			
C12:0	0.011 \pm 0.004	0.006 \pm 0.002	0.013 \pm 0.007
C14:0	0.146 \pm 0.059	0.077 \pm 0.014	0.188 \pm 0.107
C16:0	1.694 \pm 0.658	0.930 \pm 0.253	2.203 \pm 1.189
C16:1n7	0.817 \pm 0.397	0.513 \pm 0.107	0.763 \pm 0.407
C18:0	0.294 \pm 0.103	0.170 \pm 0.091	0.396 \pm 0.200
C18:1n9	2.643 \pm 0.920	1.534 \pm 0.460	3.001 \pm 1.561
C18:2n6	1.186 \pm 0.465	0.767 \pm 0.271	1.905 \pm 0.979
C20:0	0.075 \pm 0.033	0.048 \pm 0.013	0.112 \pm 0.060
C20:1n9	0.051 \pm 0.022	0.028 \pm 0.011	0.098 \pm 0.059
C20:3n3	0.015 \pm 0.007	0.009 \pm 0.005	0.017 \pm 0.009
C20:3n6/C20:4n6	0.042 \pm 0.026	0.020 \pm 0.008	0.068 \pm 0.052
Summe	6.972 \pm 2.694	4.102 \pm 1.234	8.764 \pm 4.629

Um die Einflussnahme der Bakterien auf den Fett- und Lipidstoffmetabolismus besser verstehen zu können, sollten ferner weitere Analyse zur Zusammensetzung der Lipidklassen sowie ein *Profiling* der gesamten Fettsäuren erfolgen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Interaktion zwischen den *Coriobacteriaceae* und dem Wirt eine physiologische Änderung im Lipidstoffwechsel bedingt. Auffällig war, dass die beschriebenen Beobachtungen nur innerhalb der 'Corio'-assoziierten Mausgruppe, welche die Gallensäurehaltige Kontrolldiät (BA) für 16 Wochen erhielt, auftraten.

Die nutritive Aufnahme von Gallensäuren geht mit einer erhöhten Gallensäurenkonzentration im Gastrointestinaltrakt einher (vgl. 2.2.4). Gallensäuren als effektive Emulgatoren sind maßgeblich an der Solubilisierung von Lipiden beteiligt und ermöglichen durch Mizellenbildung die lipolytische Zersetzung sowie die Resorption der Fette (siehe Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 2.2). Vermutlich kann eine gesteigerte Absorption von Lipiden mit einer Erhöhung der Fettgewebsmasse in Korrelation gebracht werden.

2.2.3.3 Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf den Gallensäurenstoffwechsel im WAT

Um zu überprüfen, ob die morphologischen und metabolischen Veränderungen im WAT von 'Corio'- C57BL/6N Mäusen unter BA-Intervention mit Veränderungen der Gallensäurehomöostase einhergehen, wurde das Gallensäurenprofil bestimmt. Hierfür wurde das gesammelte weiße Fettgewebe mittels der etablierten LC-ESI-MS/MS-Methode auf den quantitativen Gehalt an unkonjugierten (UBA, *Unconjugated Bile Acids*) und konjugierten (CBA, *Conjugated Bile Acids*) primären bzw. sekundären Gallensäuren untersucht.

Die in Abbildung D-20 dargestellten Diagramme zeigen, dass im Vergleich zu keimfreien und 'Corio'-assoziierten Tieren sowohl im mWAT als auch im eWAT (statistisch nicht signifikant, $P > 0.05$) eine höhere Konzentration an UBA in SPF-C57BL/6N Mäusen nachzuweisen war, die sich auf die metabolische Aktivität eines Darmmikrobioms zurückführen lassen.

Diese Beobachtung kann ebenfalls der in Abbildung D-20 gezeigten *Heatmap* (Ergebnisse relativ zu GF (BA)) entnommen werden. Im Vergleich zu den Gruppen GF und 'Corio' bilden die freien Gallensäuren v.a. die Muricholsäuren β -, α - sowie ω -MCA neben CA und dem sekundär Metabolit DCA den Großteil der Gesamtgallensäurekonzentration im Fettgewebe der SPF-C57BL/6N Mäuse. Während im mWAT keine Unterschiede hinsichtlich der Gallensäureverteilung in GF- und 'Corio'-assoziierten C57BL/6N Mäusen erkennbar war, führte die Kolonisierung mit *Coriobacteriaceae* im eWAT zu einer signifikanten Abnahme (** $P < 0.01$) um das bis zu 7-Fache an T- α -MCA, T- β -MCA, TCDCA und TCA. Im Gegenzug blieb die detektierte Konzentration der freien Spezies verglichen mit den Ergebnissen in GF-C57BL/6N Mäusen unberührt. Unterschiede im Gallensäuremuster der GF- und 'Corio'-C57BL/6N Mäuse im mWAT konnte nicht detektiert werden.

Allgemein konnten im mWAT deutlich höhere Gallensäurekonzentrationen gemessen werden. Mesenteriales Fettgewebe ist ein Darm-assoziiertes Fettgewebe, welches den Darmtrakt umschließt, wodurch der kausale Zusammenhang zwischen der hohen Konzentration an Gallensäuren und Wirkungsort leicht hergestellt werden kann.

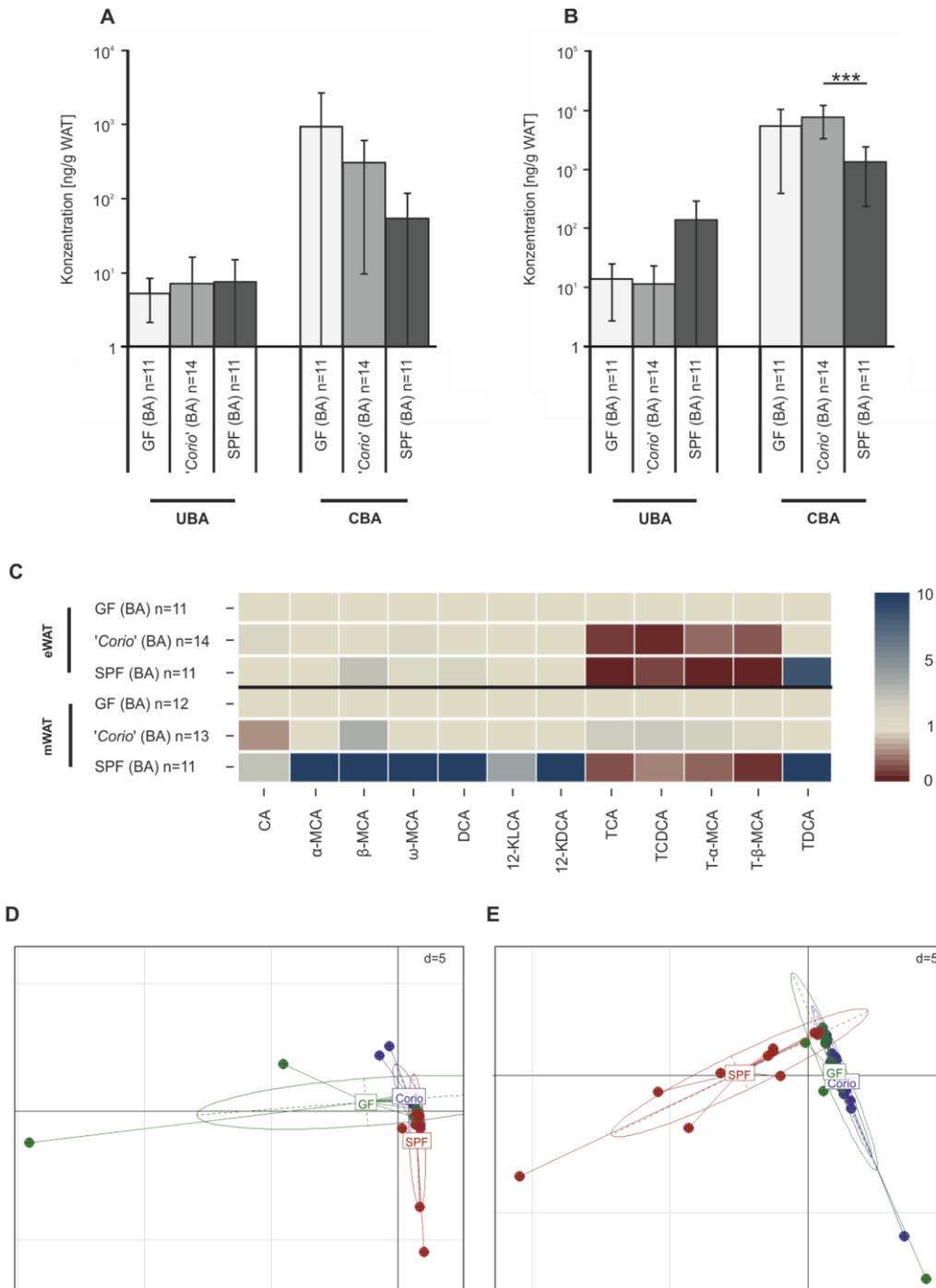


ABBILDUNG D-20 Analyse des Gallensäureprofils der C57BL/6N Mäuse im weißen Fettgewebsdepot (WAT). **A & B:** Die Zusammensetzung des Gallensäurenspektrums im Fettgewebe von GF- und 'Corio'-C57BL/6N Mäusen wurde durch konjugierte Gallensäuren (CBA) dominiert (**A**: eWAT). Nur im mWAT (**B**) konnte ein signifikant höherer Anteil an freien Gallensäuren (UBA) in SPF-Tieren detektiert werden. Die Daten sind in Relation zu GF (BA) dargestellt. **C:** Die Kolonisierung mit *Coriobacteriaceae* resultierte in signifikanten Veränderungen der Gallensäuregehalte im eWAT (signifikante Abnahme des quantitativen Anteils an T-α-MCA, T-β-MCA, TCA und TCDCa, ** $P < 0.01$). Das Gallensäureprofil der SPF-C57BL/6N Mäuse wurde durch eine höhere Konzentration an freien Gallensäurenmetaboliten charakterisiert. Allerdings konnte im PCA-Plot (**D**: eWAT, **E**: mWAT), basierend auf der Quantifizierung der Gallensäuren, keine Separierung der des Metabolitenprofils der GF- und 'Corio'-assoziierten C57BL/6N Mäuse erkannt werden.

Die Berechnung der signifikanten Unterschiede erfolgte mittels einer *Two-Way-ANOVA*. Die Methode nach Holm-Sidak wurde als *Post-Hoc-Verfahren* verwendet: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2.4 Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf das Gallensäurenprofil im Caecum

Das Caecum (Blinddarm) weist – im Vergleich zu den weiteren Kompartimenten des Darms – Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung auf. Neben einem niedrigeren physiologischen pH-Wert und einer höheren Konzentration an flüchtigen Fettsäuren, beherbergt das Caecum ferner Substrate, die damit der Verdauung im Dünndarm umgehen²³⁰. Das gesammelte Caecum wurde mittels der etablierten LC-MS/MS-Methode auf den quantitativen Gehalt an unkonjugierten (UBA) und konjugierten (CBA) primären bzw. sekundären Gallensäuren untersucht.

SAYIN et al. (2013) demonstrierten bereits in einer Mausstudie, dass die Gesamtgallensäurenkonzentration (TBA, *Total Bile Acid Concentration* = Summe aus UBA und CBA) bei keimfreien Versuchstieren im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Mäusen im Caecum signifikant erniedrigt ist⁹⁴. Im Rahmen der durchgeführten Studie konnte diese Beobachtung bei CD- und HFD-gefütterten SPF-C57BL/6N Mäusen bestätigt werden. Im Vergleich zu keimfreien und '*Corio*'-assoziierten Versuchstieren war der TBA-Gehalt signifikant erhöht. Dieser Anstieg wird durch eine gesteigerte Konzentration an UBA begründet, die sich auf die metabolische Aktivität eines Darmmikrobioms zurückführen lassen. Parallel konnte eine signifikante Reduktion im Konzentrationsprofil der CBA im Vergleich zu GF- und '*Corio*'- C57BL/6N Mäusen unter BA und HFD-Intervention festgestellt werden. Da eine fettreiche Ernährung den Durchgang des Chymus durch den Darmtrakt verlangsamt, sind die Darmbakterien den Gallensäuren länger ausgesetzt, wodurch mehr Gallensäurespezies metabolisiert werden können¹²¹. Daneben sezerniert der Organismus, speziell bei Aufnahme fettreicher Nahrung, vermehrt Gallensäurenflüssigkeit in den Intestinaltrakt, wodurch die gesteigerte Konzentration an CBA in GF- und '*Corio*'- C57BL/6N Mäusen unter HFD begründet werden kann.

Die orale Aufnahme von CA und CDCA über die Nahrung (BA-Diät) führte erwartungsgemäß zu höheren Konzentrationen an UBA als auch an CBA. Durch den niedrigen pH-Wert (pH 4 - 5) im Darm der Maus liegen freie Gallensäuren überwiegend in der protonierten Form vor und können sehr effektiv passiv im Ileum resorbiert werden²³¹. Dadurch gelangt die Mehrheit der unkonjugierten Gallensäuren über die enterohepatische Zirkulation zur Leber, wo der Großteil der Aminosäure Taurin konjugiert wird. Durch diesen physiologischen Effekt kann das Zusammenspiel aus nutritiver Aufnahme von freien Gallensäuren und der gesteigerten Konzentration an CBA in GF- und '*Corio*'-C57BL/6N Mäusen kausal erklärt werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Werte für UBA und CBA die Auswirkung der Diäten auf die Gallensäurenkonzentration im Caecum widerspiegeln. Grundsätzlich kann anhand der ermittelten Daten festgestellt werden, dass statistisch signifikante Unterschiede zwischen SPF und GF- bzw. *Coriobacteriaceae*-assoziierten C57BL/6N Mäusen ausgemacht werden können. Allerdings zeigten '*Corio*'-C57BL/6N Mäuse – gleichgültig welche Ernährung sie erhielten – nur marginale, nicht statistisch signifikante Unterschiede zu der keimfreien Spezies.

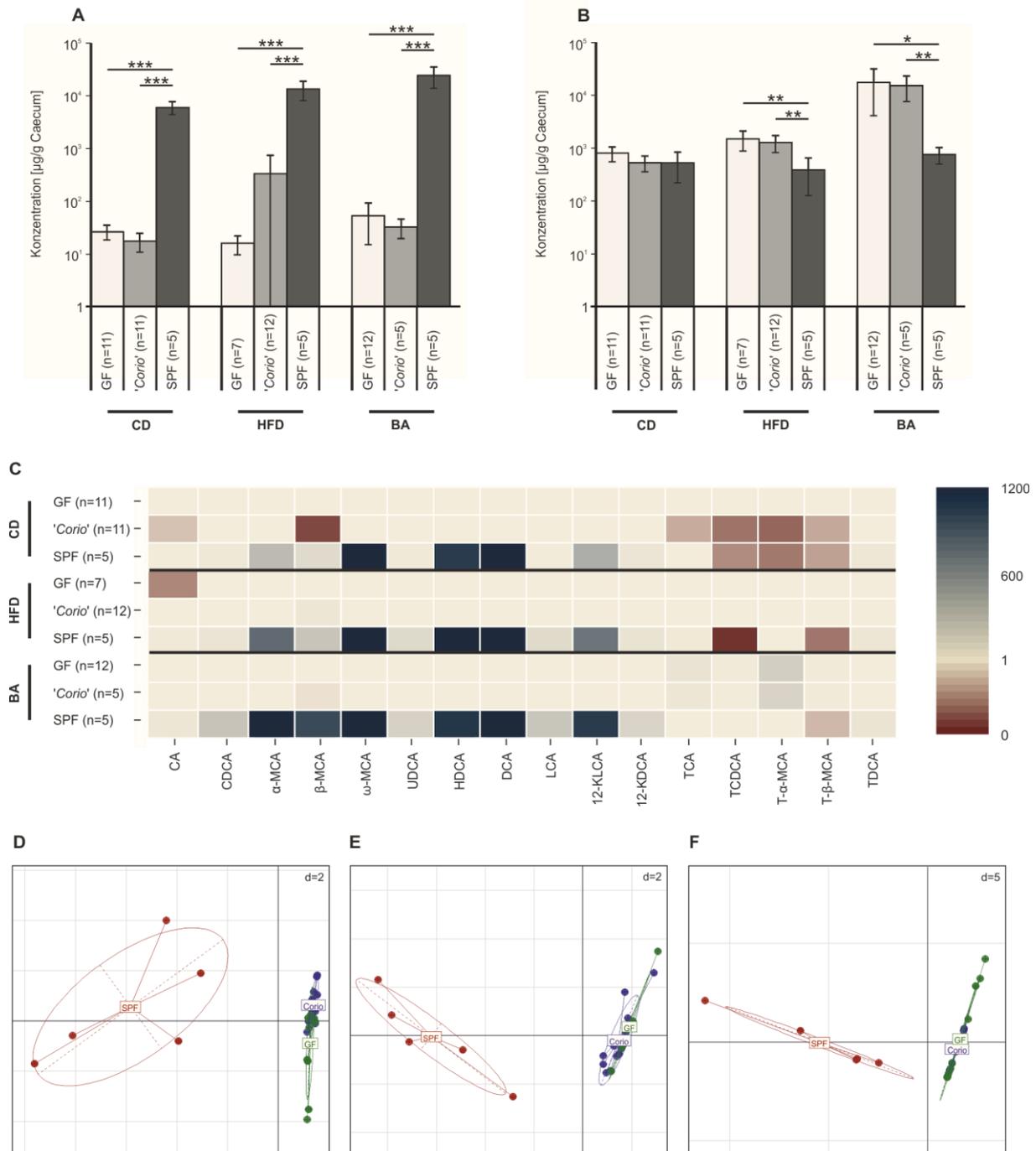


ABBILDUNG D-21 Gallensäureprofile der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) im Caecum. A & B: Die Zusammensetzung des Gallensäurenspektrums im Caecum von SPF-C57BL/6N Mäusen wurde durch unkonjugierte Gallensäuren (**A**) dominiert, wobei konjugierte Gallensäuren (**B**) in GF- und 'Corio'-C57BL/6N Mäusen die Mehrheit repräsentieren. **C:** Das Gallensäureprofil der SPF-C57BL/6N Mäuse wurde durch eine höhere Konzentration an freien Gallensäuremetaboliten charakterisiert (Daten sind relativ zu GF (CD) dargestellt). IM PCA-Plot (**D**: CD, **E**: HFD, **F**: BA), basierend auf der Quantifizierung der Gallensäuren, keine Separierung der der Metabolitenprofile der GF- und 'Corio'-assoziierten C57BL/6N Mäuse erkannt werden.

Zur besseren Übersicht sind nur die Signifikanzen innerhalb einer Fütterungsgruppe dargestellt (**A & B**). Zwischen den Fütterungsgruppen ergaben sich die folgenden signifikanten Unterschiede. **UBA:** $P < 0.01$, SPF (CD) - SPF (BA), **CBA:** $P < 0.01$, GF (CD) - GF (HFD) und GF (HFD) - GF (BA), $P < 0.001$, GF (CD) - GF (BA), 'Corio' (CD) - 'Corio' (HFD), 'Corio' (CD) - 'Corio' (BA) und 'Corio' (HFD) - 'Corio' (BA). Die Berechnung der signifikanten Unterschiede erfolgte mittels einer *Two-Way-ANOVA*. Die Methode nach *HOLM-SIDAK* wurde als *Post-Hoc*-Verfahren verwendet: $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$.

Wie der *Heatmap* (Ergebnisse sind relativ zu GF (CD) dargestellt) in Abbildung D-21 zu entnehmen ist, verschob sich durch die Fütterung mit CA und CDCA (BA-Diät) der Gallensäurenpool zugunsten der beiden Gallensäuren und den daraus abgeleiteten Taurinkonjugierten Verbindungen. Freies CDCA konnte nur im Caecum der SPF-C57BL/6N Mäuse nachgewiesen werden.

Die Hepatozyten von Nagetieren weisen die Besonderheit auf, aus CDCA durch eine 6 β -Hydroxylierung α -MCA bilden zu können. Durch eine weitere Epimerisierung der 7 α -Hydroxylgruppe entsteht β -MCA^{232,233}. Somit stellte neben TCA die Muricholsäuren T- α -MCA und T- β -MCA die Mehrheit der CBAs im Caecum aller C57BL/6N Mäuse. Vergleichend zu den GF- und 'Corio'-Tieren ließen sich im Caecum der SPF-Versuchstiere deutlich geringere Konzentrationen an T- β -MCA feststellen, wohingegen das Level an TCA zwischen den einzelnen Mausgruppen der drei Fütterungsgruppen (CD, HFD und BA) vergleichbar war.

SAYIN et al. stellten bereits 2013 beim Vergleich der Gallensäureprofile keimfreier und konventioneller *Swiss Webster*-Mäuse eine deutliche Reduktion im T- β -MCA-Level fest, wohingegen die Konzentration an TCA unbeeinflusst blieb⁹⁴. Muricholsäuren weisen eine geringere Hydrophobizität als die primären Gallensäuren auf und bilden natürliche Antagonisten des FXR, wohingegen CA und CDCA eine höhere Affinität aufweisen. Ein niedriger T- β -MCA-Spiegel fördert daher die FXR-induzierte FGF15-Expression im Ileum und bewirkt somit eine Hemmung der *CYP7A1*-Expression – dem Schlüsselenzym der Gallensäurenbiosynthese – in der Leber (vgl. Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 2.3). Zusammenfassend zeigten die Daten der Studie, dass die Darmmikrobiota nicht nur den sekundären Gallensäurenstoffwechsel reguliert sondern durch die Änderung des Gallensäurenpools auch die Gallensäurenbiosynthese beeinflusst⁹⁴.

Der erste Schritt in der bakteriellen Transformation von Gallensäuren stellt die Spaltung der Peptidbindung unter Bildung freier, unkonjugierter Gallensäuren dar, welcher durch das Enzym BSH katalysiert wird. Aufgrund stereochemischer Behinderungen können weitere mikrobielle Reaktionen wie beispielsweise Dehydroxylierung und Dehydrierung der Hydroxylgruppen am Steran-Grundgerüst, erst nach Dekonjugation erfolgen (vgl. Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 2.4).

In dem durchgeführten Fermentationsexperiment konnte unter den verwendeten Bedingungen *in vitro* aufgezeigt werden, dass drei der vier ausgewählten *Coriobacteriaceae*-Stämme über die Fähigkeit verfügen, konjugierte Gallensäuren in freie Spezies zu transformieren (vgl. Teil D – Ergebnisse & Diskussion Nr. 2.1.1). Im Vergleich zu den keimfrei gehaltenen C57BL/6N Mäusen konnte *in vivo* nur in CD-gefütterten 'Corio'-C57BL/6N Mäusen eine Reduktion der Konzentration an den folgenden Taurinkonjugierten Gallensäuren: TCA, TCDCA, T- α -MCA und T- β -MCA detektiert werden. Die Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant ($P > 0.05$). Wie zu erwarten, war die Konzentration an Taurinkonjugaten in SPF-C57BL/6N Mäusen der Fütterungsgruppe CD und BA erniedrigt. Übereinstimmend mit der erniedrigten Konzentration an CBA, war der Anteil an ungebundenen primären Gallensäuren CA, CDCA, α -MCA und β -MCA, um ein Vielfaches erhöht.

Da eine Dekonjugation der gebundenen Gallensäuren ausschließlich in SPF-C57BL/6N Mäusen beobachtet wurde, konnte die Bildung sekundärer Gallensäurenmetabolite, die durch bakterielle Metabolisierung via 7 α -Dehydroxylierung aus CA und CDCA im Darm entstehen, nur in den konventionellen Versuchstieren gezeigt werden. Erwartungsgemäß nahm durch die nutritive Aufnahme von Gallensäuren (BA-Diät) der Gehalt an DCA und LCA im Caecum zu (***) ($P < 0.001$, bezogen auf SPF (CD)).

Dieser Anstieg konnte ebenfalls bei SPF-C57BL/6N Mäusen, welche der HFD-Fütterungsgruppe angehörten, erkannt werden (* $P < 0.05$, bezogen auf SPF (CD)). Bei der Aufnahme fettreicher Nahrung werden Gallensäuren verstärkt in das Duodenum sezerniert, wodurch eine gesteigerte Bildung von sekundären Gallensäuren induziert wird. Der, aufgrund des hohen Fettanteils, verlangsamte Durchgang des Nahrungsbreis durch den Verdauungstrakt trägt dabei indirekt zur gesteigerten Bildung der Sekundärmetabolite bei. Jedoch wurde nur DCA als Taurinkonjugierte Gallensäure (TDCA) im Caecum detektiert, während das Taurinkonjugat von LCA – TLCA – nicht nachgewiesen wurde. Dieser Umstand liegt vermutlich darin begründet, da ungebundenes LCA größtenteils über die Fäzes aus dem Organismus eliminiert wird. Die geringe Resorbierbarkeit im Dickdarm kann der niedrigen Wasserlöslichkeit und/oder der Bindung an Bakterien zugeschrieben werden. Nur ein sehr geringer Anteil gelangt über die enterohepatische Zirkulation zur Leber, wo LCA in den Hepatozyten bevorzugt sulfatiert bzw. glucuronidiert und über den renalen und/oder enteralen Weg ausgeschieden wird¹¹⁶.

Unabhängig von der fehlenden BSH-Aktivität der untersuchten *Coriobacteriaceae*-Stämme *in vivo*, wurde – nach jetzigem Kenntnisstand – das Vermögen zur Dehydroxylierung der 7 α -Hydroxylgruppe für kein Mitglied der Familie der *Coriobacteriaceae* weder in der Literatur beschrieben, noch im Fermentationsexperiment für einen der getesteten *Coriobacteriaceae*-Stämme aufgezeigt (vgl. Teil D – Ergebnisse & Diskussion Nr. 2.1.2).

UDCA, HDCA und ω -MCA, ebenfalls Umwandlungsprodukte primärer Gallensäuren die auf die Aktivität einer intestinalen Mikrobiota zurückschließen lassen, konnten nur in SPF-assoziierten Versuchstieren quantifiziert werden. Die Verbindung ω -MCA wird aus β -MCA im Intestinaltrakt über eine zweistufige Reaktionsabfolge gebildet. Neben *Clostridium sp.* wurde *Egg. lenta* (früher *E. lentum*) als Produzent des 7 β -Hydroxyl-Isomers von β -MCA identifiziert²³⁴. Allerdings konnte die Bildung von ω -MCA nach quantitativer Analyse des Caecums der 'Corio'-C57BL/6N Mäuse nicht festgestellt werden.

Darüber hinaus produzieren einige Bakterienspezies HSDH-Enzyme, die eine stereospezifische Oxidation von Hydroxylgruppen an C-3, C-7 und C-12 unter Formation stabiler Oxo-Intermediate katalysieren, wobei die Ketogruppen wiederum in stereospezifische α - bzw. β -Hydroxylgruppen umgewandelt werden können (siehe Teil B – Theoretischer Hintergrund Nr. 2.4)¹⁷³. Im Caecum der SPF-C57BL/6N Mäuse konnten die Oxogallensäuren 12-KDCA und 12-KLCA, welche durch die Aktivität des bakteriellen Enzyms 12-HSDH im Darm aus den Substraten CA bzw. DCA gebildet werden, detektiert werden. Folglich konnte bei BA- sowie HFD-gefütterten Tieren, welche aufgrund der fetthaltigen Ernährung durch eine erhöhte Gallensekretion charakterisiert sind, eine gesteigerte Konzentration im Vergleich zu den SPF-C57BL/6N Mäusen der CD-Fütterungsgruppe ausgemacht werden. Weitere Oxo-Intermediate, die durch Dehydrierung der Hydroxylgruppen am Sterankörper gekennzeichnet sind, wurden oberhalb der Nachweisgrenzen der Methode nicht detektiert.

In dem durchgeführten Fermentationsexperiment wurde unter den verwendeten Bedingungen *in vitro* aufgezeigt werden, dass drei der vier ausgewählten *Coriobacteriaceae*-Stämme durch die Expression einer 3 α - sowie 12 α -HSDH charakterisiert sind (vgl. Teil D – Ergebnisse und Diskussion Nr. 2.1.2). *C. aerofaciens* verfügt ferner über eine 7 β -HSDH. *Egg. lenta* besitzt zudem die Fähigkeit, die 3 β -Hydroxylgruppe von ungebundenen Gallensäuren zu dehydrieren⁷⁷.

Da nur 98% der synthetisierten Gallensäuren postsynthetisch mit Taurin in der Leber konjugiert werden, konnte freies CA als Substrat für bakterielle Dehydrierungsreaktionen in 'Corio'-C57BL/6N Mäusen quantitativ bestimmt werden. Dennoch ließ sich ein Nachweis, der in der Fermentation postulierten Umbauprodukte 3-KDCA bzw. 12-KDCA und somit die Aktivität einer HSDH im Caecum der *Coriobacteriaceae*-kolonisierten C57BL/6N Mäusen nicht erbringen.

Eine Studie zur Untersuchung des Gallensäurenprofils im humanen Caecum legt nahe, dass trotz einer weit verbreiteten HSDH-Aktivität der Bakterien nur wenige Oxo-Intermediate gebildet werden²²¹. RIDLON et al. (2006) vermuten, dass die HSDH-katalysierte Reaktion mit der 7 α -Dehydroxylierung in Konkurrenz steht, da diese als irreversible und zugleich energetisch günstigere Reaktion für die Mikroorganismen anzusehen ist⁷⁷.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch die selektierten *Coriobacteriaceae*-Stämme *in vivo* keine Dekonjugation der Tauringebundenen Gallensäuren und keine weiteren Transformationen der ungebundenen Gallensäuren induziert werden konnte. Statistisch signifikante Unterschiede zu der keimfreien Spezies konnten nicht aufgezeigt werden (vgl. Abbildung D-21 D - F). Diese Erkenntnis ließ zunächst die Vermutung zu, dass die Besiedlung des Gastrointestinaltraktes von keimfreien Mäusen mit den Vertretern aus der Familie der *Coriobacteriaceae* nicht erfolgreich war. Mit Hilfe einer 16S rRNA-Sequenzierung und Kultivierungsverfahren wurde die Kolonisierung der Mäuse mit dem 'Corio'-Konsortium bzw. die Keimfreiheit der keimfreien C57BL/6N Mäuse zu Beginn (1. & 2. Lebenswoche) und am Ende der Teststudie (26. Lebenswoche) in Fäzes-Proben überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass einerseits die Kolonisierung der keimfreien C57BL/6N-Mäuse (5. Lebenswoche) erfolgreich war und andererseits, dass auch nach weiteren 21. Wochen (26. Lebenswoche) die Versuchstiere immer noch mit den selektierten *Coriobacteriaceae*-Stämmen besiedelt waren. Auch die Keimfreiheit der GF-C57BL/6N Mäuse konnte aufgezeigt werden. (*Die Daten wurden von Frau Sarah Just zur Verfügung gestellt*)

Die durchgeführten Analysen von Caecum-Proben geben einen guten Einblick in die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobiota, jedoch lassen sich nur begrenzt Rückschlüsse hinsichtlich der Funktionalität und Besiedlung der Bakterien entlang des Gastrointestinaltraktes ziehen¹.

Coriobacteriaceae stellen strikte Anaerobier dar. Das Caecum bildet den Übergang zwischen Ileum und Kolon. Im Vergleich zu den Dünndarmsegmenten nimmt die Anzahl an Anaerobier in Zäkum und Kolon sprunghaft zu, wobei im Vergleich zum Caecum die Anzahl an strikt anaeroben Bakterien im Kolon nochmal deutlich erhöht ist²³⁰. Da *in vivo* keine der postulierten metabolischen Eigenschaften aufgezeigt werden konnten, liegt die These nahe, dass *Coriobacteriaceae* aufgrund der vorliegenden Umgebungsbedingungen bevorzugt das Kolon besiedeln. Die bakteriellen Transformationseigenschaften würden somit erst nach dem Passieren des Caecums zum Tragen kommen, weshalb im Caecum nur konjugierte Gallensäuren nachweisbar sind. Aus diesem Grund sollten für Folgestudien neben dem Caecum-Inhalt auch Proben aus den weiteren Kompartimenten des Intestinaltrakts v.a. Kolon und Ileum entnommen und die Zusammensetzung des Gallensäurepools ermittelt werden.

Allgemein ist hinzuzufügen, dass sich eine Postulierung der ablaufenden Gallensäuretransformationen *in vivo* als schwierig anzusehen ist, da unterschiedliche Bakterienspezies sowohl die Fähigkeit zur Dekonjugation und 7 α -Dehydroxylierung als auch zur Oxidation und Reduktion besitzen bzw. nur eine Auswahl der genannten enzymatischen Reaktionen katalysieren können.

Zudem können die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchung nur zum Teil das physiologische Verhalten der Bakterien *in vivo* projiziert werden. Insgesamt ergibt sich somit ein kompliziertes Zusammenspiel einer Vielzahl von intestinalen Mikroorganismen, die an der Metabolisierung der Gallensäuren beteiligt sind und zur Bildung eines spezifischen Gallensäurenprofils führen.

2.2.5 Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf das Gallensäurenprofil im portalen Plasma

Die Rückresorption von Gallensäuren beginnt mit der Aufnahme von über 95% der Gallensäure-Derivate im terminalen Ileum und endet via der Pfortader (portales Plasma) in der Leber im Sinne einer enterohepatischen Zirkulation. Die Untersuchung der Zusammensetzung des Gallensäurespektrums im portalen Plasma wurde eine LC-MS/MS-basierte quantitative Analyse vorgenommen.

Wie das in Abbildung D-22 A und B gezeigte Balkendiagramm darlegt, wurde im portalen Plasma von GF, 'Corio'- und SPF-Versuchstieren eine vielfach erhöhte Konzentration an CBAs ermittelt. Die Kolonisierung mit *Coriobacteriaceae* sowie einer komplexen Mikrobiota (SPF) führten unter HFD-Intervention zu einer deutlichen Abnahme an CBA im Vergleich zu den keimfreien Tieren (** $P < 0.01$, Signifikanzen bezogen auf CBA: SPF (HFD); $P > 0.05$, bezogen auf CBA: 'Corio' (HFD)). Übereinstimmend mit dem quantitativen Resultat aus den Caecum-Proben war der Gehalt an Taurin-Konjugaten in SPF-C57BL/6N Mäusen reduziert, wobei auch im portalen Plasma eine relevante statistische Signifikanz nur bei BA-gefütterten Tieren aufgezeigt werden konnte (CBA: SPF (BA): *** $P < 0.001$, Signifikanzen bezogen auf CBA: GF (BA) und CBA: 'Corio' (BA)). Neben T- β -MCA machte TCA die Hauptgallensäure im portalen Plasma aller untersuchten C57BL/6N Mäusen aus. Bei der Betrachtung der *Heatmap* (Abbildung D-22 C, alle Ergebnisse sind relativ zu GF (CD) dargestellt) wird deutlich, dass die Abnahme an CBA in SPF-assoziierten C57BL/6N Mäusen überwiegend auf die signifikante Reduktion der T- β -MCA-Konzentration zurückgeführt werden kann (*** $P < 0.001$), während die Konzentration an TCA nahezu unberührt blieb. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der untersuchten Caecum-Proben der SPF-C57BL/6N Mäuse (siehe 2.2.4).

Die nutritive Gabe von CA und CDCA über das Futter resultierte bei den GF- und 'Corio'-assoziierten C57BL/6N Mäusen in einem Anstieg an TCDCA, TCA sowie T- α -MCA, vermutlich durch eine gesteigerte Resorption im Ileum und anschließende Konjugation mit Taurin in der Leber. Besonders der Gehalt an TCDCA war bei den BA-gefütterten 'Corio'-Mäusen im Vergleich zu den GF- und SPF-Versuchstieren der gleichen Fütterungsgruppe signifikant erhöht (*** $P < 0.001$). Der reverse Effekt ließ sich bei der Analyse der Gallensäurekomposition im portalen Plasma von *Coriobacteriaceae*-assoziierten Tieren unter HFD-Intervention feststellen. Im Vergleich zu den keimfreien Versuchstieren (GF) war der Gallensäurenpool durch eine geringere Konzentration an konjugierten Gallensäuren, namentlich T- α -MCA, T- β -MCA, TCA und TCDCA, gekennzeichnet ($P > 0.05$, nicht signifikant).

Weiterhin führte die Aufnahme von primären Gallensäuren (CA und CDCA) über die Nahrung zu einer erniedrigten Konzentration an α -MCA in allen drei Mausgruppen. CDCA dient als Substrat für die Synthese von α -MCA als auch β -MCA in der Leber, wobei in der vorliegenden Studie vermutlich mehr α -MCA als Produkt gebildet wurde, was durch die erhöhte Konzentration des Taurinkonjugats T- α -MCA angezeigt wird.

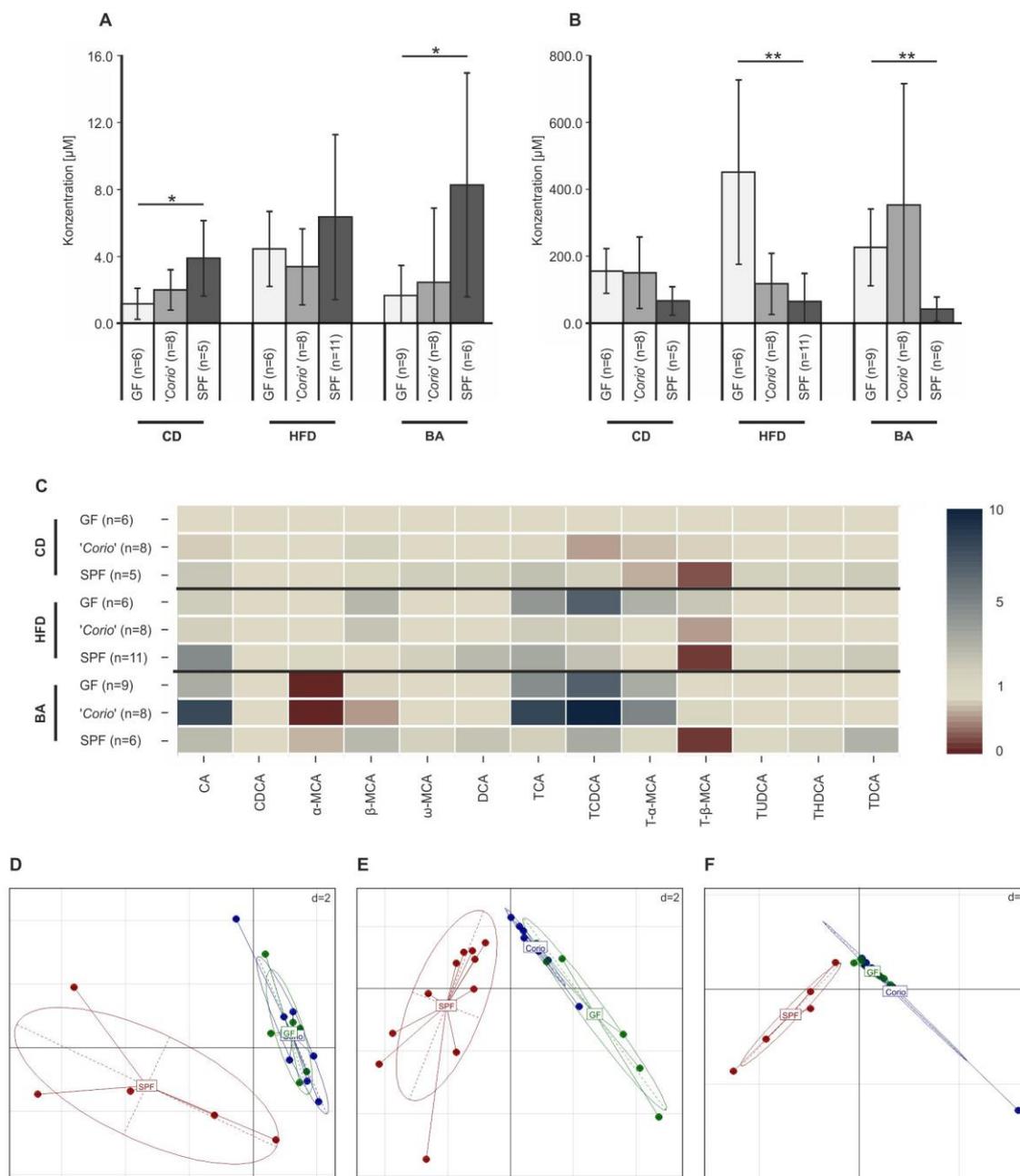


ABBILDUNG D-22 Analyse des Gallensäureprofils der C57BL/6N Mäuse (GF, 'Corio', SPF) im portalen Plasma (Pfortader). **A & B:** Die Zusammensetzung des Gallensäurespektrums im portalen Plasma von SPF-C57BL/6N Mäusen wurde durch unkonjugierte Gallensäuren (**A**, UBA) dominiert, wobei konjugierte Gallensäuren (**B**, CBA) in GF- und 'Corio'-C57BL/6N Mäusen die Mehrheit repräsentieren. **C:** Das Gallensäurenprofil der SPF-C57BL/6N Mäuse wurde durch eine höhere Konzentration an freien Gallensäurenmetaboliten charakterisiert. Nur bei der HFD-Fütterungsgruppe wies das portale Plasma der 'Corio'-C57BL/6N Mäuse eine geringere Konzentration Taurin-konjugierten Gallensäuren im Vergleich zu den GF-C57BL/6N Mäusen auf (Daten sind relativ zu GF (CD) dargestellt). Allerdings konnte im PCA-Plot (**D**: CD, **E**: HFD, **F**: BA), basierend auf der Quantifizierung der Gallensäuren, keine Separierung der Metabolitenprofile der GF- und 'Corio'-assoziierten C57BL/6N Mäuse erkannt werden.

Zur besseren Übersicht sind nur die Signifikanzen innerhalb einer Fütterungsgruppe dargestellt (**A & B**). Zwischen den Fütterungsgruppen ergaben sich die folgenden signifikanten Unterschiede. **UBA:** ** $P < 0.01$, GF (CD) - GF (HFD) und GF (HFD) - GF, **CBA:** * $P < 0.01$, GF (CD) - GF (HFD). Die Berechnung der signifikanten Unterschiede erfolgte mittels einer *Two-Way-ANOVA*. Die Methode nach *HOLM-Sidak* wurde als *Post-Hoc*-Verfahren verwendet: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Analog zu den Beobachtungen im Caecum führte eine HFD- bzw. BA-Fütterung aufgrund des gesteigerten Angebots an freien primären Gallensäuren verstärkt zu einem Anstieg des sekundären Gallensäuremetaboliten DCA sowie TDCA in SPF-C57BL/6N Mäusen (***) ($P < 0.001$, Signifikanzen bezogen auf SPF (CD)). Auch ω -MCA, ein bakterielles Umwandlungsprodukt aus β -MCA, ließ sich bei SPF-Tieren detektieren. Im Vergleich zum Gallensäurenpool des Caecums fiel die Abwesenheit von Oxogallensäuren auf.

Um zu beurteilen wie die Kolonisierung des Darms die Zusammensetzung des Gallensäuren-pools im portalen Plasma beeinflusst, wurde eine PCA zur besseren graphischen Veranschaulichung des komplexen Datensatzes durchgeführt (vgl. Teil G – Material und Methoden Nr. 3.2). Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit einer Darmmikrobiota (SPF-C57BL/6N Mäuse) die Zusammensetzung des Gallensäuren-pools beeinflusst. Allerdings konnte keine Separierung des Gallensäurenprofils GF- und 'Corio'-assoziierten C57BL/6N Mäusen erkannt werden.

Teil E – Zusammenfassung

Gallensäuren sind essenzielle Biomoleküle, die an der Regulation einer Vielzahl von biochemischen Stoffwechselwegen wie dem Energie-, Glukose- und Cholesterolmetabolismus beteiligt sind. Aus diesem Grund können Veränderungen der physiologischen Zusammensetzung des Gallensäurenpools mit der Ätiologie von metabolischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Das Vorhandensein einer geeigneten analytischen Methode stellt dabei eine unerlässliche Voraussetzung für die Untersuchung des Gallensäurenmetabolismus in verschiedenen biologischen Matrices dar.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von analytischen Methoden für die direkte und simultane Bestimmung von Gallensäuren auf Basis der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) in verschiedenen Matrices beschrieben. Dennoch weisen viele Methoden analytische Defizite, aufgrund geringer Spezifität durch die Verwendung vom SIM-Modus, der Koelution von isobaren Gallensäuren und von aufwendigen Probenvorbereitungsverfahren, auf. Der **erste Teil** dieser Arbeit beschreibt daher die Entwicklung einer geeigneten Analysenmethode für die Identifizierung und Quantifizierung freier und konjugierter Gallensäuren.

Die erste Herausforderung bei der Methodenentwicklung bestand in der Erstellung der massenspektrometrischen Methode. Da freie Gallensäuren im negativen Ionenmodus nur eine geringe Neigung zur Fragmentierung aufweisen, erfolgte die Quantifizierung der Analyten in der Vergangenheit oftmals im SIM-Modus. Diese Form der Detektion weist nur eine sehr geringe Spezifität und Selektivität, speziell bei der Analytik von komplexen biologischen Proben, auf.

In den durchgeführten Fragmentierungsexperimenten konnte ebenfalls im negativen Ionenmodus für die unkonjugierten Gallensäuren im Vergleich zu ihren amidierten Vertretern keine substanzspezifischen Fragmentmuster erhalten werden. Durch den Wechsel zum positiven Ionenmodus konnte für alle Analyten – mit Ausnahme von LCA und Iso-LCA – fragmentreiche Massenspektren erhalten werden. Das Problem, das durch den Wechsel des Ionenmodus verursachten Intensitätsverlusts, konnte durch die Zugabe des *Modifiers* Ammoniumacetat gelöst werden. Die Implementierung von drei verschiedenen Massenspuren gewährleistet ein hohes Maß an Selektivität auch in Gegenwart komplexer Matrix.

Bei der Betrachtung der MRM-Übergänge wurde eine Vielzahl von isobaren Massenübergängen strukturell verwandter Gallensäuren identifiziert. In diesem Falle muss die Retentionszeit als weiteres Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden, was eine chromatographische Basislinientrennung aller isobaren Analyten voraussetzt.

Durch die Variation verschiedener Chromatographiebedingungen (stationäre Phase, Laufmittelzusammensetzung, pH-Wert des Gradienten und Gradientenverlauf) konnte die chromatographische Separierung aller Stellungsisomere erzielt werden, was die selektive Quantifizierung von früher oftmals als Summenparametern bestimmten Analyten ermöglicht. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer RP C18-Phase. Die erforderliche chromatographische Auflösung konnte durch die Wahl eines Acetonitril-Methanol-Gemisches (3:1, v/v) als organische Laufmittelkomponente sowie eines aciden pH-Werts des Eluentensystems erreicht werden.

Bezugnehmend auf die Probenvorbereitung konnten die herkömmlichen, zeitintensiven SPE-Verfahren durch eine simple und schnelle Extraktionsmethode mit Methanol abgelöst werden.

Hohe, reproduzierbare Wiederfindungsraten unterstreichen die Leistungsfähigkeit des Probenaufarbeitungsverfahrens. Die dadurch deutlich verringerte Analysendauer leistet einen großen Beitrag für die Anwendbarkeit der Methode in der Routineanalytik.

Durch eine anschließend durchgeführte Methodvalidierung nach den Vorgaben der FDA konnten der Nachweis und die Dokumentation über die Zuverlässigkeit sowie die Qualität der Methode erbracht werden. Die entwickelte LC-MS/MS-Methode ist geeignet, um verlässliche und reproduzierbare Daten für die Bestimmung von Gallensäuren in den Matrices Plasma, Fettgewebe, Fäzes und Zellkulturnährmedium zu liefern.

Die Bestimmungsgrenzen individueller Gallensäuren liegen in Abhängigkeit der Matrix im zwei- bis dreistelligen nmol/L-Bereich und sind mit den Daten der Literatur vergleichbar.

Der **zweite Teil** dieser Arbeit fokussierte sich auf die Anwendbarkeit der Methode zur Untersuchung des Einflusses der *Coriobacteriaceae* auf die Gallensäuretransformation. Das Auftreten dieser Bakterien korreliert positiv mit dem Cholesterol- und Lipidstoffwechsel, weshalb die physiologische Bedeutung im Wirtsorganismus näher studiert werden sollte.

Hierfür wurden zunächst vier *Coriobacteriaceae*-Stämme selektiert und deren Vermögen Gallensäuren zu metabolisieren in einem *in vitro*-Testansatz charakterisiert. Drei der vier erwähnten Bakterien aus dem *Coriobacteriaceae*-Konsortium waren *in vitro* durch das Auftreten der Enzyme BSH und HSDH charakterisiert, wodurch sie an der Hydrolyse konjugierter Gallensäuren sowie der stereospezifischen Oxidation bzw. Reduktion der Hydroxylgruppen am Sterankörper beteiligt sind.

In einer *in vivo*-Studie mit gnotobiotischen Mäusen, die mit Bakterien aus dem *Coriobacteriaceae*-Konsortium kolonisiert wurden, zeigte sich, dass die Interaktion von *Coriobacteriaceae* und einer Gallensäurehaltigen Diät mit Veränderungen des Lipidstoffwechsels assoziiert werden können. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren die Mäuse durch einen erhöhten Fettgewebsanteil bei gleichbleibender Körpermasse sowie einer erniedrigten Konzentration an freien Fettsäuren im Fettgewebe charakterisiert. Um den Einfluss der *Coriobacteriaceae* auf die Lipidhomöostase genauer bewerten zu können, müssen jedoch weitere Untersuchungen hinsichtlich der Zusammensetzung der Lipidklassen erfolgen.

Interessanter Weise konnte bei der Analyse der Gallensäurenprofile im Fettgewebe, portalen Plasma und Caecum der mit den *Coriobacteriaceae* erfolgreich kolonisierten Versuchstieren keine signifikanten Unterschiede zu den keimfreien Mäusen aufgezeigt werden. Trotz des im *in vitro*-Versuch nachgewiesenen Potenzials zur Gallensäuretransformation ist eine Projektion der ablaufenden biochemischen Reaktionen *in vivo* als schwierig anzusehen ist, da unterschiedliche Bakterienspezies die Fähigkeit zur Metabolisierung von Gallensäuren besitzen bzw. nur eine Auswahl der genannten enzymatischen Reaktionen katalysieren können. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die *Coriobacteriaceae* die Anwesenheit einer Vielzahl von weiteren intestinalen Mikroorganismen, die ebenfalls an der Metabolisierung der Gallensäuren beteiligt sind, bedarf, damit ihre metabolischen Eigenschaften zum Tragen kommen.

Zusammenfassend konnte in der vorgestellten Arbeit eine schnelle, leistungsstarke und sensitive LC-MS/MS-Multimethode entwickelt werden, die es erlaubt, 34 stoffwechselassoziierte freie und konjugierte Gallensäuren innerhalb eines kurzen Analysenzeitraums simultan nebeneinander zu bestimmen. Die Anwendbarkeit der Methode für die Untersuchung des Metabolismus von Gallensäuren konnte für *in vitro*- als auch *in vivo*-Experimente erfolgreich demonstriert werden.

Teil F – Summary

Bile acids are essential biomolecules that play an important role in a wide range of physiological processes such as glucose, lipid and cholesterol metabolism. Initial diagnoses of metabolic diseases are often made by investigating physiological changes in circulating bile acid pool in plasma, urine, and feces of patients. Therefore, it is important to set up a valuable bioanalytical method for the screening of bile acid profiles in different biological specimens.

In the recent years, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) has become an accepted analytical approach for the direct and simultaneous quantification of bile acids in tissues and biofluids. However, the majority of methods suffers from a lack of selectivity when applying SIM mode, insufficient chromatographic baseline separation of isobaric metabolites or exhausted pre-analytical procedures. Therefore, the first part of this present work deals with the development of a powerful analytical approach for the simultaneous identification and quantification of free and conjugated bile acids.

The first challenge was to establish a selective and reliable mass spectrometric method. According to findings in the literature, the MS/MS-analysis reconfirmed that unconjugated bile acids were resistant to fragmentation in the collision-induced fragmentation process.

However, switching the mass spectrometric system to positive ion mode led to formation of characteristic fragment pattern for both free and conjugated bile acids. The loss in signal intensity was compensated by the use of ammonium acetate as modifier. Thus, ammonia adducts represented the most prominent precursor ions.

Caused by the implementation of three mass transitions, the mass spectrometric method showed a high degree of selectivity and interferences with background signals especially in complex matrices can be avoided.

Most of the metabolites represent structural isomers, differing only in the stereospecific configuration and position of hydroxyl groups at the steroid nucleus. Thus, when using MRM it is impossible to distinguish between isobaric bile acids. In this case, a sufficient baseline separation is indispensable for the quantification of individual bile salts.

By testing several analytical conditions (mobile phase composition and pH of the eluent system) and chromatography columns, the chromatographic baseline separation of all unconjugated and conjugated bile acid metabolites could be realized. Separation of analytes was achieved using a RP C18 column and a mixture of acetonitrile/methanol (3/1, v/v) at acidic pH as the organic part of the mobile phase system.

The majority of the methods shows disadvantages caused by a series of laborious sample preparation steps when employing SPE. In contrast, recovery rates were maximized by a simple and fast one-step liquid-liquid-extraction using methanol. The capability and quality of the established sample preparation procedure were demonstrated by high mean values between 81,5% and 107,1% in the presence of complex matrices. The short analysis times and the efficiency of the extraction method make a major contribution for the applicability in routine diagnostics.

Finally, the LC-MS/MS-procedure was validated according to the bioanalytical method validation protocol provided by FDA to ensure high sensitivity, accuracy, and precision. The results indicate that this analytical method is accurate and precise for the quantification of bile acids in the presence of complex biological matrices.

The usability of the present method was checked for investigating bile acid transformation of dominant gut bacteria. Members of the family *Coriobacteriaceae* are able to metabolize cholesterol-derived compounds and their occurrence has been already linked to metabolic disturbances. However, their ability to modulate bile acid metabolism and their impact on host health is poorly understood.

Primarily, the *in vitro* bile acid conversion capacity of conjugated and primary bile acids by four *Coriobacteriaceae* strains was investigated. The results indicated that three of the selected bacterial strains were characterized by the action of bile salt hydrolase (BSH) and hydroxysteroid dehydrogenase (HSDH).

To clarify the importance of *Coriobacteriaceae* on bile acid homeostasis *in vivo*, the execution of a gnotobiotic mouse model demonstrated the interactions between gut bacteria, nutrition and the host with respect to the modulation of lipid metabolism. Compared to germfree (GF) and specific pathogen free mice (SPF), *Coriobacteriaceae*-associated mice fed a bile acid-enriched diet were marked by an increased white adipose tissue mass accompanied by a lower abundance of free fatty acids. However, no significant difference between the bile acid profiles of *Coriobacteriaceae*- and GF-mice in caecum, WAT and portal plasma were observed. As bile acid transformation ability of *Coriobacteriaceae* was shown, these findings indicate that *Coriobacteriaceae* may require the presence and interaction with other microorganisms to develop their physiological effect to the full.

In conclusion, this work presents the development of a rapid LC-MS/MS method, suitable for the simultaneous determination of 34 free and conjugated bile acids in feces, plasma, WAT, and bacterial broth. Improvements compared to previously described LC-MS/MS methods were observed regarding selectivity, separation of isobaric bile acids and analysis time. This novel LC-MS method represents a valuable tool for screening bile acid profiles in routine clinical practices.

Teil G – Material und Methoden

1 Analytik von Gallensäuren

1.1 Chemikalien und biologisches Material

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Chemikalien in molekularbiologischer Qualität oder in höchstmöglicher Reinheit verwendet. Ein detailliertes Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte einschließlich Herstellerangaben und Spezifikationen ist im Teil I – Anhang, Tabelle I-11 bis I-13 angegeben. Das zu untersuchende biologische Probenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung und Messung im Tiefkühler bei - 80 °C aufbewahrt. Die Lagerung aller Standardlösungen erfolgte bei - 20 °C.

1.1.1 Herstellung von Stammlösungen sowie Multistandards

Zur Entwicklung einer *targeted Metabolomics*-Applikation für die Quali- und Quantifizierung von Gallensäuren wurden 34 verschiedene Metabolite verwendet (siehe Teil I – Anhang, Tabelle I-1). Die Quantifizierung der Analyten sollte über eine externe Kalibrierung mit interner Standardkalibrierung erfolgen. Daher wurden strukturell ähnliche deuterierte Verbindungen (d4-CA, d4-GCDCA) ausgewählt, die als relative Bezugsgröße für die spätere Quantifizierung (IS, Interner Standard) dienen sollten. Diese kommen auf Grund ihrer geringen Halbwertszeit gar nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen im tierischen Organismus vor. Angesichts ihrer verringerten Molekularmassen können sie massenspektrometrisch leicht von anderen Substanzen unterschieden werden.

- **Stammlösung**

Für die Entwicklung einer LC-MS/MS-Applikation wurden, von den Standardsubstanzen, Stammlösungen hergestellt. Hierfür wurde die jeweilige Substanz exakt auf einer Analysenwaage in einen Messkolben eingewogen und mit dem entsprechenden Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch auf ein genau definiertes Volumen aufgefüllt. Verbindungen, welche nur als Hydrate kommerziell zu erwerben waren, wurden zuvor im Trockenschrank bei 103 ± 1 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet.

- **Multistandard**

Die Erstellung des Multistandards erfolgte durch Mischung definierter Volumina der Stammlösungen mit Methanol. Die Wahl der Analytkonzentration im Prüfstandard orientierte sich an den physiologischen Konzentrationsbereichen individueller Gallensäuren, welche durch den vorläufigen Arbeitsbereich abgedeckt wurden.

Als Datengrundlage dienten Veröffentlichungen und Studien, die sich mit der Untersuchung und Analyse von Gallensäuren sowohl in murinen als auch humanen Proben beschäftigen. Da in der *Mouse Multiple Tissue Metabolome DataBase* (MMMDB) bisher keine Publikation von wissenschaftlich fundierten Werten zu Gallensäuren erfolgte, wurden zusätzlich die Daten aus der *Human Metabolome DataBase* (HMDB) herangezogen. Nach der Analyse des ersten Probenmaterials wurden teilweise die Konzentrationen einzelner Substanzen den später zu untersuchenden Proben weiter angepasst.

- **Interner Standard (IS)**

Definierte Volumen der Standard-Lösungen der drei deuterierten Verbindungen wurden vermischt und mit Methanol auf ein definiertes Volumen aufgefüllt, sodass eine finale Konzentration von 100 µM d4-CA und 100 µM d4-GCDCA erzielt wurde. Diese Lösung wird nachfolgend als IS bzw. IS-Mix bezeichnet.

- **Externe Kalibrierung**

Für die Quantifizierung der Metaboliten in den verschiedenen Matrices als auch für Methodenvvalidierung wurde der dargestellte Multistandard mit Methanol so verdünnt, dass ein definierter Konzentrationsbereich abgedeckt wurde. Zu jedem Kalibrierstandard wurde die identische Volumenmenge des IS-Gemisches gegeben, sodass in allen Prüfstandards dieselbe Konzentration vorlag.

1.2 Entwicklung der LC-MS/MS-Messmethode

Im Rahmen der Arbeit sollte eine LC-ESI-MS/MS-Multimethode zur absoluten Quantifizierung von Gallensäuren entwickelt werden. Die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie trägt einerseits dazu bei Ionensuppressionseffekte zu minimieren und andererseits die Substanzen vor der massenspektrometrischen Analyse aufzutrennen. Speziell im Hinblick auf isobare Verbindungen, welche ein identisches oder ähnliches Massenspektrum aufweisen, ist für eine separate Quantifizierung eine chromatographische Trennung der Analyten unabdingbar.

1.2.1 Entwicklung der MRM-Methode

Zur Erhöhung der Selektivität sollte das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) verwendet werden. Hierfür mussten zunächst für jeden Analyten das substanzspezifische Fragmentspektrum ermittelt werden. Via Direkteinlass, unter Zuhilfenahme einer Spritzenpumpe (Fließgeschwindigkeit 10 µL/min), wurden die verdünnten Stammlösungen (10 µM) direkt in die ESI-Quelle des Massenspektrometers (API QTRAP® 4000, SCIEX, Darmstadt, DE) eingebracht. Über das Tool „*Automatic Compound Optimazation*“ der Analyst® Software wurden sowohl für das *Precursor*-Ion der Verbindung als auch für die drei intensivsten Fragment-Ionen die optimalen Einstellungen für die elektrische Spannung der Ionenoptik und der Quadrupole im positiven und negativen Ionenmodus ermittelt.

Sowohl im negativen als auch positiven Ionenmodus konnte die Entstehung des negativen $[M+H]^-$ bzw. des positiven $[M+H]^+$ Basispeaks beobachtet werden. Durch den Zusatz von Ammoniumacetat (10 mM) zur Messlösung resultierte im positiven Ionenmodus die Bildung des Ammonium-Addukts $[M+NH_4]^+$ als intensivstes *Precursor*-Ion für die Mehrheit der Analyten. Für diese Massen wurde ebenfalls eine Optimierung der massenspektrometrischen Parameter vorgenommen. Das Fragment-Ion mit der höchsten Intensität wird nachfolgend mit der Abkürzung *Qnt*, das zweit- und dritt-intensivste als *Qal 1* und *Qal 2* bezeichnet.

In der MRM-Methode wurde anschließend für jeden Analyten nur diejenige Ionisierungsart bzw. der Massenübergang als *Qnt* verwendet, bei dem die höchste Intensität und somit die niedrigste Nachweisgrenze erzielt werden konnte.

Für alle Substanzen resultierte im positiven Ionenmodus eine deutliche gesteigerte Signalintensität im Vergleich zum negativen Ionenmodus. Lediglich die beiden Gallensäuren LCA und Iso-LCA konnten nur schlecht im positiven Modus ionisiert werden, die maximale Intensität wurde im negativen Modus erzielt. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Methoden, erfolgte die Messung der beiden Gallensäuren im SIM-Modus, da keine charakteristischen Fragment-Ionen identifiziert werden konnten. Um die Intensität der Signale weiter zu optimieren, wurden die voreingestellten Parameter für das *Curtain Gas* und das *Collision Gas* zwischen den einzelnen Messungen des Multistandards in der LC-MS/MS-Methode variiert.

Die Optimierungen wurden nur in den Bereichen vorgenommen, die vom Hersteller des Massenspektrometers als Referenz vorgeschlagen werden²³⁵. Eine zusammenfassende Darstellung aller Massenübergänge und optimierten MS-Parameter, eingeteilt in Messperioden, sowie die Geräteeinstellung des Massenspektrometers, ist in Teil I – Anhang, Tabelle I-2 und I-3 angegeben.

1.2.2 Entwicklung des flüssigkeitschromatographischen Systems

Innerhalb der Stoffklasse der Gallensäuren unterscheiden sich viele relevante Analyten nur durch die Stellung einzelner polarer Seitengruppen im Sinne einer Stellungsisomerie. Aufgrund des identischen Molekulargewichts können daher keine spezifischen Massenübergänge im Massenspektrometer erhalten werden. Da diese Metabolite innerhalb ihrer assoziierten Stoffwechselwege teilweise unterschiedlichste biochemische Funktionen übernehmen, war es das Ziel, durch eine flüssigchromatographische Trennung der Analyten eine selektive Quantifizierung zu ermöglichen und eine Bestimmung als Summenparameter zu verhindern.

Im Rahmen der Arbeit wurden unterschiedliche Eluenten, Gradientenverläufe sowie variierende Flussraten erprobt. Weiterhin standen 4 verschiedene RP-Chromatographiesäulen zur Verfügung:

- RP CN (Nucleodur, 100 x 3.0 mm i.D., 3.0 µm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
- RP C18 (Nucleoshell, 100 x 2.0 mm i.D., 2.7 µm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
- RP C18 (Nucleoshell, 150 x 2.0 mm i.D., 2.7 µm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
- RP C18 (Kinetex, 150 x 2.1 mm i.D., 2.6 µm, Phenomenex® Inc.)

Die Parameter der optimierten Chromatographiebedingungen der entwickelten Methode sind in Tabelle G-1 dargestellt. Eine schematische Übersicht des optimierten Gradienten wird in Abbildung G-1 gegeben.

TABELLE G-1 Chromatographiebedingungen der finalen RP-Methode für die LC-MS/MS-basierte Bestimmung von Gallensäuren.

Spezifikation																						
HPLC-Pumpe	Agilent 1260 <i>Infinity Quaternary LC System</i>																					
Eluent A	H ₂ O + 10 mM Ammoniumacetat + 0.1% FA																					
Eluent B	ACN/MeOH (3/1, v/v) + 10 mM Ammoniumacetat + 0.1% FA																					
Flussrate	200 µL/min																					
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>Eluent A</th> <th>Eluent B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 min</td> <td>70%</td> <td>30%</td> </tr> <tr> <td>5 min</td> <td>70%</td> <td>30%</td> </tr> <tr> <td>25 min</td> <td>0%</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>50 min</td> <td>0%</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>52 min</td> <td>30%</td> <td>30%</td> </tr> <tr> <td>62 min</td> <td>30%</td> <td>30%</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	Eluent A	Eluent B	0 min	70%	30%	5 min	70%	30%	25 min	0%	100%	50 min	0%	100%	52 min	30%	30%	62 min	30%	30%
Zeit [min]	Eluent A	Eluent B																				
0 min	70%	30%																				
5 min	70%	30%																				
25 min	0%	100%																				
50 min	0%	100%																				
52 min	30%	30%																				
62 min	30%	30%																				
Säulenofen	Agilent <i>Column Oven</i>																					
Chromatographiesäule	Phenomenex® Kinetex® C18, 150 x 2.1 mm i.D., 2.6 µm																					
Säulenofentemperatur	30 °C																					
Autosampler	Agilent <i>Autosampler</i>																					
Probentemperatur	4 °C																					
Injektionsvolumen	5 µL																					
Software	Analyst® Software (Version 1.6.1)																					

FA: Ameisensäure (*Formic Acid*), ACN: Acetonitril, MeOH: Methanol

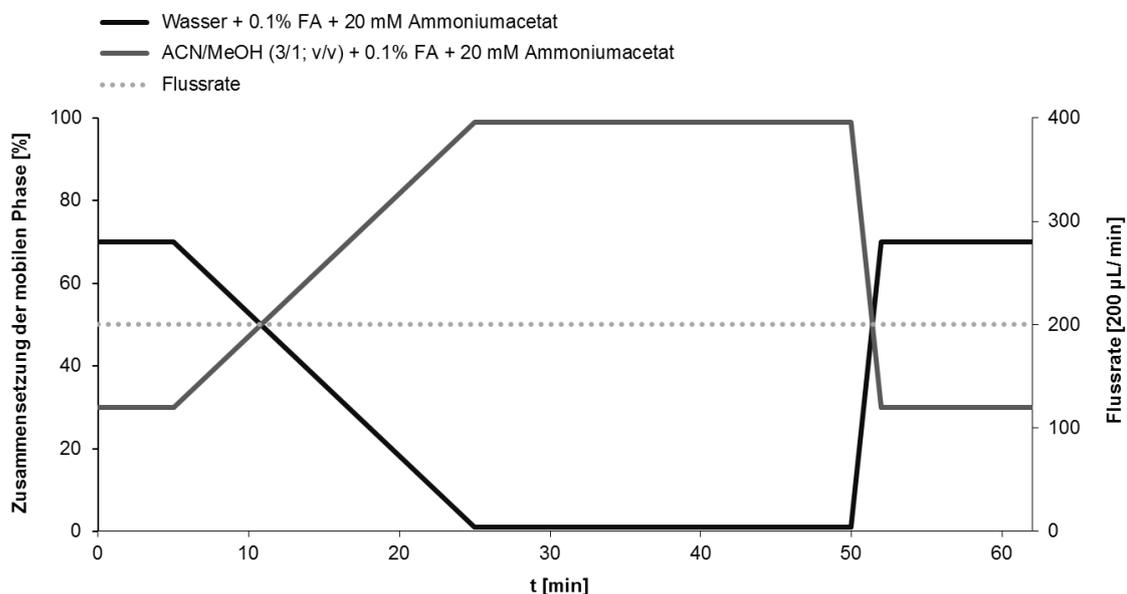


ABBILDUNG G-1 Gradientenverlauf der flüssigkeitschromatographischen Methode. FA: Ameisensäure (*Formic Acid*), ACN: Acetonitril, MeOH: Methanol

1.3 Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine LC-MS/MS-Methode für die routinemäßige Quantifizierung von Gallensäuren in biologischen Geweben und Flüssigkeiten wie z.B. Blutplasma, Fäzes und Fettgewebe mit einem hohen Probendurchsatz entwickelt werden. Daher war es erstrebenswert eine schnelle und effiziente Aufarbeitungsmethode zu etablieren. Als klassisches Verfahren wurde die Festphasenextraktion (SPE) dem Extraktionsverfahren mit organischen Lösungsmitteln gegenübergestellt. Für die Evaluation einer geeigneten Probenvorbereitung wurde aus jeder Untergruppe der Gallensäuren ein repräsentativen Vertreter (CA, 3-DHCA, 6,7-DKLCA, TCDCA & GUDCA) ausgewählt.

1.3.1 Festphasenextraktion

Bereits 4 in der Literatur beschriebene Extraktionsverfahren zur Isolierung von Sterolen wurden getestet und ihre analytische Performance im Hinblick auf die prozentuale Wiederfindungsrate bewertet. BURKHARD et al. (2005) entwickelten ein Extraktionsprotokoll für die Matrix Plasma, basierend auf einer alkalischen Equilibrierung der stationären Phase (Methode M1)¹⁹⁸, während im Protokoll von YE et al. (2007) saure Bedingungen für die Vorkonditionierung des Säulenmaterials und das Waschen beschrieben werden (Methode M2)¹⁹⁴. Die zwei weiteren SPE-Methoden sind charakterisiert durch unpolare Bedingungen unter Verwendung von Methanol oder *n*-Hexan im Elutionsschritt (Methoden M3 und M4)^{207,215}.

Die Aufreinigung erfolgte jeweils an Varian Bond Elut[®] RP-C18-Kartuschen. Die Vorgehensweise der vier genannten Aufarbeitungsmethoden ist in nachstehender Tabelle angegeben.

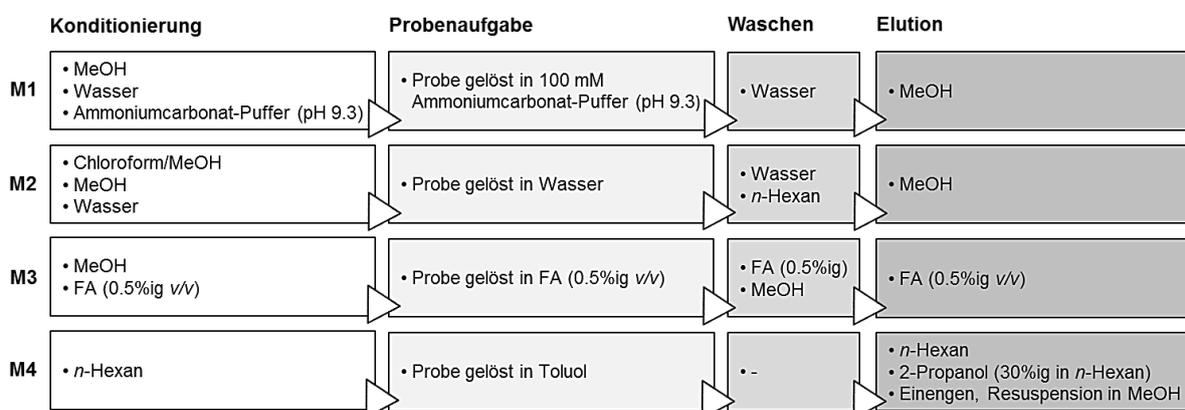


ABBILDUNG G-2 Zusammenfassende Darstellung der getesteten SPE-Methoden für die Isolierung von Gallensäuren. **M1:** Methode nach BURKHARD et al. (2005), **M2:** Methode nach PERWAIZ et al. (2001), **M3:** YE et al. (2007), **M4:** McDONALD et al. (2007), MeOH: Methanol, FA: Ameisensäure (*Formic Acid*)

Um die prozentuale Wiederfindung zu bestimmen, wurde eine Probenlösung gemäß den Vorgaben aus der Literatur (siehe Abbildung G-2) mit den fünf ausgewählten Gallensäuren hergestellt. Die Konzentration je Gallensäure betrug 5 µM (= Testlösung). Für die Probenaufgabe nach der Konditionierung des Säulenmaterials wurden je 500 µL der Testlösung eingesetzt. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung (n = 3) vorgenommen. Die prozentuale Wiederfindung wurde wie folgt erhalten:

$$\text{WDF} = \frac{C_{\text{Probe}}}{C_{\text{eingesetzt}}} \cdot 100\% \quad (1)$$

1.3.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das biologische Probenmaterial für die Evaluation der Probenvorbereitung und der folgenden Matrixkalibrierung stammte von Mäusen ohne spezifische Intervention und wurde freundlicherweise von Frau Dr. Clara John und Frau Dr. Anna Worthmann (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung für Biochemie und Molekulare Zellbiologie) zur Verfügung gestellt. Die Tierexperimente waren allesamt genehmigt durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg.

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit einer simplen Flüssig-Flüssig-Extraktion als Aufarbeitungsmethode wurden die Matrices Plasma, Fäzes, Fettgewebe und Zellkulturnährmedium mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (c_1 : niedrig, c_2 : mittel, c_3 : hoch) des Multistandards dotiert. Nach der Extraktion mit Methanol wurden die Konzentrationen mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode bestimmt. Nach Abzug der endogenen Metabolitkonzentration der undotierten Matrix (C_{endogen}), die auf gleiche Weise wie die dotierten Proben behandelt wurden, konnte die Wiederfindung nach Gleichung (2) berechnet werden.

$$\text{WDF} = \frac{C_{\text{Probe}} - C_{\text{endogen}}}{C_{\text{eingesetzt}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Für alle drei Konzentrationsniveaus wurde jeweils eine Dreifachbestimmung ($n = 3$) durchgeführt. Die verwendeten Matrices wurden folgendermaßen aufgearbeitet:

- Plasma**
- 50 μL Plasma werden mit 125 μL Methanol und 25 μL IS-Mix versetzt
 - Inkubation 10 min bei RT unter konstanten Schütteln
 - Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 100 μL Überstand werden mit 3 verschiedenen Volumina des Multistandards dotiert (= c_1 , c_2 und c_3)
- Fäzes**
- 10 mg lyophilisierte und gemörserte Fäzes werden in 2 mL Methanol (enthält den IS: d4-CA: 100 μM , d4-GCDCA: 100 μM) suspendiert
 - Inkubation 10 min bei RT unter konstanten Schütteln
 - Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 100 μL Überstand werden mit 3 verschiedenen Volumina des Multistandards dotiert (= c_1 , c_2 und c_3)
- Fettgewebe**
- 20 mg Fett werden mit 2 mL Methanol versetzt und der Ansatz mit einem Ultra-Turrax (Stufe 4, 3 x 20 sec) homogenisiert
 - Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 100 μL Überstand werden mit 3 verschiedenen Volumina des Multistandards dotiert (= c_1 , c_2 und c_3)
- Nährmedium**
- 25 μL des Zellkulturnährmediums werden mit 3 verschiedenen Volumina des Multistandards dotiert (= c_1 , c_2 und c_3)

1.4 Methodenvalidierung

Mit der Durchführung einer Methodenvalidierung soll gezeigt und für die Qualitätssicherung dokumentiert werden, dass eine analytische Messmethode für die spezielle, gegebene Fragestellung reproduzierbare und verlässliche Daten liefert. Der Nachweis, dass eine Analysenmethode für die quantitative Bestimmung der Analyten in einer biologischen Matrix geeignet ist, wird erbracht, indem das Verfahren nach einer vorgeschriebenen Richtlinie validiert wird. Die FDA erarbeitete 2001 die *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*, die als Leitlinie für den Ablauf des Validierungsprozess von (bio)-analytischen Methoden anzusehen ist²¹⁷. Die dabei gewonnenen analytisch-chemischen Leistungsmerkmale sind die Selektivität, Spezifität, Linearität, Präzision, Richtigkeit, Wiederfindung und die analytischen Grenzwerte (Nachweis- und Bestimmungsgrenze).

1.4.1 Selektivität und Spezifität

Spezifität stellt das Potenzial eines Analysenverfahrens dar einen Analyten akkurat und störungsfrei in Anwesenheit weiterer Komponenten der Probe, wie z.B. Matrixbestandteile und Abbauprodukte, erfassen und identifizieren zu können. Die Fähigkeit einer Prüfmethode mehrere Analyten ohne gegenseitige Beeinflussung oder Störungen durch endogene und exogene Substanzen (Verunreinigungen, Matrixbestandteile) nebeneinander präzise zu erfassen und zu quantifizieren, wird als Selektivität der Methode beschrieben.

Durch die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie werden die Analyten nicht nur anhand ihrer Massen identifiziert, die Retentionszeit fungiert als weiteres Selektionsmerkmal. Dennoch muss bei einer Validierung nachgewiesen werden, dass die analytische Methode ein qualitativ richtiges Ergebnis liefert und das falsch positive Ergebnisse (v.a. durch Matrixpeaks) bzw. falsch negative Ergebnisse, verursacht v.a. durch Matrixeffekte sowie Ionensuppressionen ausgeschlossen werden können.

1.4.2 Linearität

Der lineare Anwendungsbereich gibt das Intervall zwischen unterer und oberer Konzentration eines Analyten wieder, bei dem ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und dem Messsignal vorliegt, sowie ein akzeptables Maß an Präzision und Richtigkeit gegeben ist. Der Arbeitsbereich sollte so gewählt werden, dass die zu erwartende Analytkonzentration in der Probe weitestgehend abgedeckt wird. Die Güte der Kalibrierfunktion wird durch den Korrelationskoeffizienten R^2 und die Steigung m beschrieben.

Die Validierung einer Messmethode beginnt stets mit der Wahl eines vorläufigen linearen Arbeitsbereiches, von dem erwartet werden kann, dass er das Konzentrationsspektrum des Analyten bzw. einer Serie von Analyten in den Untersuchungsproben miteinschließt. Der physiologische Konzentrationsbereich individueller Gallensäuren wurde zwei verschiedenen Datenbanken (MMMDB und HMDB) sowie unterschiedlichsten Publikationen auf dem Gebiet der Gallensäureanalytik entnommen. Unter Einbeziehung einer natürlichen Schwankung von 25% wurde ein temporärer Kalibrationsbereich erhalten. Dieser wurde gegebenenfalls nach der Bestimmung der Validierungsparameter jedem Analyten gesondert angepasst.

1.4.2.1 Grundkalibrierung

Um zu überprüfen, ob überhaupt eine lineare Korrelation zwischen der Analytkonzentration und dem Detektorsignal (= Systemlinearität) vorliegt, wurde zunächst die Linearität anhand von Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration ermittelt. Typische Charakteristika und Störfaktoren einer Analysenmethode wie z.B. Matrixeinflüsse werden nicht berücksichtigt.

Die Grundkalibrierung erfolgte als Fünffachbestimmung matrixfreier Kalibrierlösungen. Dazu wurden fünf Kalibrierreihen mit jeweils zwölf Kalibrierpunkten aufsteigender Konzentration hergestellt und mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode untersucht.

1.4.2.2 Matrixkalibrierung

Bei realen Proben kommt es oftmals zu einer Abweichung des Analysenwertes vom wahren Probenwert (Methodenlinearität). Um zu überprüfen, ob die entwickelte Prüfmethode anwendbar auf komplexe Matrixproben ist, wurde mit Hilfe einer Matrixkalibrierung der Einfluss von Matrixbestandteilen untersucht.

Zur Kalibration wurde aufgearbeitete Matrix mit den Standardgemischen in äquidistanter Konzentration dotiert und vermessen. Pro Prüfstandard wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Matrixproben wurden folgendermaßen hergestellt:

- Plasma**
 - 400 µL EDTA-Plasma werden mit 1600 µL Methanol versetzt
 - Inkubation 10 min bei RT unter konstanten Schütteln
 - Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 20 µL Überstand werden zur Herstellung der Matrixstandards eingesetzt
- Fäzes**
 - 20 mg lyophilisierte und gemörserte Fäzes werden in 2 mL Methanol suspendiert
 - Inkubation 10 min bei RT unter konstanten Schütteln
 - Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 33 µL Überstand werden zur Herstellung der Matrixstandards eingesetzt
- Fettgewebe**
 - 500 mg Fett werden mit 3 mL Methanol versetzt und der Ansatz mit einem Ultra-Turrax (Stufe 4, 3 x 20 sec) homogenisiert
 - Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 2 mL des Überstandes werden entnommen und unter einem leichten N₂-Strom zur Trockne eingeeengt
 - Rückstand wird in 1 mL Methanol resuspendiert
 - 15 µL der Lösung werden zur Herstellung der Matrixstandards eingesetzt
- Nährmedium**
 - 25 µL des Zellkulturnährmediums werden zur Herstellung der Matrixstandards eingesetzt

1.4.2.3 Statistische Prüfung auf Linearität

Im optimalen Fall sollte mit einer linearen Kalibrierfunktion gearbeitet werden und nur in Ausnahmefällen auf eine quadratische Regression zurückgegriffen werden. Im einfachsten Fall erfolgt die Untersuchung der Linearität durch graphische Darstellung der Kalibrationsdaten und visuelle Beurteilung, wobei grobe Abweichungen leicht erkannt werden können. Da nicht immer ein linearer Zusammenhang gegeben ist, muss im Rahmen der Validierung geprüft werden, welches mathematische Modell die Abhängigkeit zwischen Signal und Konzentration am besten beschreibt²³⁶.

Die Bestimmung der Kalibrierfunktion erfolgt am einfachsten durch die graphische Darstellung der Kalibrierdaten und der subjektiven Beurteilung. Daneben wurde die lineare Regression durchgeführt, wobei das Bestimmtheitsmaß R^2 , die Steigung m , und der y-Achsenabschnitt b ermittelt wurden. Sollte keine offensichtliche Unlinearität erkennbar sein, kann auf einen gesonderten statistischen Linearitätstest verzichtet werden. In Zweifelsfällen sollte jedoch eine rechnerische Überprüfung der Linearität vorgenommen werden.

Neben der visuellen Prüfung auf Linearität kann mit Hilfe der Residualanalyse geprüft werden, ob das zu Grunde gelegte funktionelle Kalibriermodell die Messdaten ausreichend beschreibt. Die Residuen d_i ergeben sich aus der vertikalen Abweichung der Messwerte von der berechneten Regressionsgeraden.

$$d_i = y_i - \hat{y}_i \quad (3)$$

y_i Messsignal an i-ter Stelle
 \hat{y}_i zu y_i zugehöriger Wert, berechnet aus der Regressionsfunktion

Eine weitere Möglichkeit zu prüfen, ob das gewählte Kalibriermodell die Messergebnisse hinreichend beschreibt, ist der Anpassungstest nach MANDEL. Der Test geht von der These aus, dass die Abweichung der Messwerte von der Regressionsgeraden durch Unlinearität verursacht wird und durch die Wahl eines anderen Regressionsmodells z.B. einer Kalibrierfunktion 2. Grades verringert werden kann²³⁶. Die Reststandardabweichung der linearen Regression S_R und der quadratischen Funktion S_{RQ} wurden mit Hilfe der folgenden Gleichungen (4) und (5) ermittelt. Die Reststandardabweichung spiegelt die Präzision der linearen bzw. der quadratischen Regression wieder und gibt ein Maß für die Streuung der Residuen, also Streuung der Messwerte in y-Richtung um die Regressionsgerade bzw. der Kurve an. Je größer der Wert, desto stärker streuen die Residuen, d.h. umso geringer ist die Präzision.

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (4)$$

$$S_{RQ} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 3}} \quad (5)$$

Im Falle, dass $S_R < S_{RQ}$ kann angenommen werden, dass die Kalibrierfunktion im ausgewählten Messbereich als linear anzusehen ist²¹⁶. Um rechnerisch die statistische Signifikanz nachzuweisen, wurde mit Hilfe des Anpassungstests nach MANDEL aus den Reststandardabweichung S_R und S_{RQ} die Differenz der Abweichungsvarianzen Δs^2 berechnet.

$$\Delta s^2 = (n - 2) \cdot S_R^2 - (n - 3) \cdot S_{RQ}^2 \quad (6)$$

Nach Gleichung (7) wurde der Prüfwert PG ermittelt, welcher über einen F-Test abgeglichen wurde. Hierbei wird die Verringerung der Varianz, die sich aufgrund der Wahl des quadratischen Regressionsmodells im Vergleich zur linearen Anpassung ergibt, auf Signifikanz geprüft:

$$PG = \frac{\Delta s^2}{S_{RQ}^2} \quad (7)$$

Die erhaltene Prüfgröße PG wird mit dem Wert aus der F-Tabelle ($P = 0.01$, $f_1 = 1$, $f_2 = n - 3$) verglichen. Hierbei gilt, ist $PG < F$ -Wert dann ist der Unterschied nicht signifikant und die Kalibrierfunktion im untersuchten Konzentrationsbereich als linear anzusehen. Für den Fall, das der F-Test einen signifikanten Unterschied anzeigt, d.h. $PG > F$ -Wert, ist das quadratische Kalibriermodell zu bevorzugen. Im festgelegten Konzentrationsbereich besteht keine direkte Proportionalität zwischen dem Messsignal und der Analytkonzentration. Um eine Auswertung mittels quadratischer Regression zu verhindern sollten einzelnen Verfahrensschritte überprüft, der Arbeitsbereich eingengt oder in einen anderen Konzentrationsbereich verschoben werden, um eine ausreichende Linearität zu erzielen. Der Test auf Homogenität der Varianzen ist zu wiederholen.

Normalverteilte Daten und die Varianzhomogenität der Messsignale sind Voraussetzungen für die Regressionsanalyse. Die lineare Regression geht von einer konstanten Unpräzision der Messwerte über dem gesamten Messbereich aus.

Bei der Überprüfung der Präzision des Verfahrens durch einen Varianzhomogenitätstest wird die Streuung zwischen jeweils bei der niedrigsten und der höchsten Konzentration getrennt voneinander analysiert. Die Varianz s^2 der Messwertserien wird nach folgender Gleichung (8) berechnet, wobei n die Konzentration des niedrigsten und N die des höchsten Messwert widerspiegelt:

$$s_{n \text{ bzw. } N}^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1} \quad (8)$$

Die Varianzen der Messwertserie werden mittels des F-Test ($P = 0.01$, $f = n - 1$) auf Varianzhomogenität überprüft.

$$PG = \frac{s_N^2}{s_n^2} \quad (9)$$

Liegt der berechnete F-Wert (hier Prüfgröße PG) unter dem Tabellenwert ($F > PW$), so wird kein signifikanter Unterschied der Varianzen angezeigt. Liegt eine Varianzheterogenität vor d.h. $F < PW$, sollte zunächst ein anderer Konzentrationsbereich gewählt und der Test auf Varianzhomogenität wiederholt werden²³⁶.

Im Falle, dass nach der Optimierung des Verfahrens immer noch keine Varianzhomogenität erreicht werden kann, ist die Kalibrierfunktion 2. Grades (quadratische Regression) zur Auswertung der Messdaten heranzuziehen.

Eine weiteres Gütekriterium bei der Kalibrierungsbewertung ist die relative Verfahrensstandardabweichung S_V (= Verfahrensvariationskoeffizient). Diese ist auf die Mitte des Konzentrationsbereiches (Abszisse des Schwerpunktes der Regressions- bzw. der Kalibriergeraden) normiert. Sie ergibt sich aus dem Quotienten der Reststandardabweichung S_R bzw. S_{RQ} der linearen bzw. quadratischen Regression und der Steigung m der Kalibriergeraden.

$$S_V = \frac{S_R}{m} \cdot 100\% \quad (10)$$

1.4.3 Präzision

Die Messpräzision ist ein Maß für die Übereinstimmung voneinander unabhängiger Analysenergebnisse bei sich wiederholenden, gleichbleibenden Operationsbedingungen einer Messmethode in kurzen Zeitintervallen (Wiederholpräzision = *Intra-Day* Präzision). Werden Durchführungsparameter am identischen Untersuchungsobjekt variiert, z.B. die Zeitpunkte der Messungen, ist von der *Inter-Day* Präzision die Rede, welche einen Grad für die Streuung der Prüfergebnisse verschiedener Messserien widerspiegelt.

Um das Maß der Streuung der Analyseergebnisse bewerten zu können, wurde das Präzisionsmaß, repräsentiert durch den Variationskoeffizienten C_V , aus der Standardabweichung s und dem Mittelwert \bar{x} berechnet. Nach den Vorgaben der FDA sollte dieser Wert die Marke von 15% nicht überschreiten²¹⁷.

$$C_V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (11)$$

Bei einer Validierung geht es darum, die Präzision durch wiederholte Messungen von Kontrollproben (QC, *Quality Control*) bekannter Konzentration zu bestimmen. Hierfür wurden fünf matrixhaltige Kontrollproben bei drei unterschiedlichen Konzentrationen (QC1, QC2 & QC3) hergestellt. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass einerseits der gesamte, zuvor ermittelte lineare Arbeitsbereich abgedeckt wurde und andererseits die Konzentration des ersten Standards (QC1) in der Nähe der Nachweisgrenze, QC2 in der Mitte des linearen Arbeitsbereichs und die Konzentration des höchsten Standards (QC3) am oberen Ende des Kalibrierbereichs lagen. Für die Bestimmung der *Inter-Day* Präzision der Analysenmethode wurden je drei Proben, welche zur Bestimmung der Wiederholpräzision eingesetzt wurden, an drei ($n = 3$) verschiedenen Untersuchungstagen vermessen.

1.4.4 Genauigkeit

Ein Maß für durch systematische und zufällige Fehler verursachte Abweichung des gemessenen Wertes vom wahren Analysenwert (Sollwert) der Probe wird durch den Validierungsparameter der Genauigkeit beschrieben.

Die Ermittlung der Genauigkeit wurde für drei Konzentrationsniveaus durchgeführt (QC1, QC2 & QC3). Hierbei wurde die jeweilige Matrix mit verschiedenen Analytkonzentrationen dotiert und vermessen. Die Bestimmung der *Inter-Day* Genauigkeit erfolgte ebenfalls an drei aufeinander folgenden Tagen. Da keine Blankmatrix zur Verfügung stand, mussten zusätzlich noch undotierte Matrixproben (QC0) untersucht werden. Die berechnete Konzentration an endogener Gallensäure wurde vom Messergebnis der QC1, QC2 & QC3-Proben subtrahiert. Das Ausmaß der Genauigkeit wird gewöhnlich als relativer Fehler (RE) ausgedrückt:

$$RE = \frac{(C_{\text{gemessen}} - C_{\text{zugesezt}})}{C_{\text{zugesezt}}} \cdot 100\% \quad (12)$$

1.4.5 Wiederfindung

Die Wiederfindung ist definiert als das Verhältnis des Signals einer zugesezten Menge Analyt zu einer biologischen Probe zum Signal eines reinen Standards. Im Idealfall sollte die ermittelte Konzentration im Standard und der aufgearbeiteten Probe identisch sein. Anhand des Prozentwertes der Wiederfindung lässt sich die Effizienz der Aufarbeitung ersehen. Eine annehmbare Konstanz der Wiederfindungsrate, also die Reproduzierbarkeit der Messmethodik, ist hierbei ebenfalls als wichtiger Parameter zu beachten.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden jeweils drei QC-Proben im niedrigen und hohen Konzentrationsbereich analysiert und die Konzentrationen der Probenpeaks mit den bekannten, zudotierten Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.3.2).

1.4.6 Analytische Grenzwerte

Die Nachweisgrenze x_{NWG} (= LLoD) eines Prüfverfahrens stellt die kleinste noch messbare Konzentration eines Analyten dar, welche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 50% detektiert, aber nicht mehr quantifiziert werden kann. Sie stellt die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Analyten in der Probe dar.

Im Vergleich zur Nachweisgrenze repräsentiert die Bestimmungsgrenze x_{BG} (= LLoQ) die geringste quantifizierbare Konzentration eines Analyten in der Untersuchungsprobe, welche mit einer akzeptablen Messpräzision und Messgenauigkeit ermittelt werden kann. Signale, welche die Bedingungen nicht erfüllen, können nicht korrekt quantifiziert werden und müssen bei der Auswertung gekennzeichnet werden.

Die analytischen Grenzwerte müssen als rein qualitative Größen angesehen werden, welche lediglich eine Aussage über die Empfindlichkeit der Messmethode liefern. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist für das gesamte Verfahren für alle relevanten Matrices zu ermitteln.

Die Bestimmung kann, gemäß DIN 32645, einerseits indirekt durch ein mathematisches Modell (Kalibriergeradenmethode)²¹⁸ oder direkt nach der Leerwertmethode erfolgen, wobei beide Verfahren in der Regel gleichwertige Resultate liefern.

Leerproben dürfen dabei den zu analysierenden Stoff nicht enthalten, müssen aber mit der Analysenproben in ihrer sonstigen Beschaffenheit (Matrix) übereinstimmen.

Da dieses Kriterium in der vorliegenden Arbeit nicht gegeben war, wurde die Kalibriergeradenmethode angewendet, bei der aus drei Matrixdotierten Kalibriergeraden ($n = 5$) im Bereich der erwartenden analytischen Grenzwerte, die Nachweisgrenze x_{NWG} und die Bestimmungsgrenze x_{BG} berechnet wurden:

$$x_{NWG} = \frac{S_R}{m} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

$$x_{BG} = k \cdot \frac{S_R}{m} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{1}{k} \cdot \frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (14)$$

S_R	Reststandardabweichung
m	Empfindlichkeit bzw. Steigung der Kalibriergeraden
t	Quantil der t-Verteilung ($n - 2$)
k	Faktor, relative Ergebnisunsicherheit: 33%
p	Anzahl der Parallelbestimmungen
n	Anzahl der Kalibrationspunkte
\bar{x}	Mittelwert der Konzentration
x_i	Messwert

1.4.7 Stabilität

Jedes Analysenverfahren muss gewährleisten, dass die zu untersuchenden Analyten in der gegebenen Matrix oder Lösemittel während der Lagerung keinem Abbau unterliegt. Bereits publizierte, umfangreiche Studien zur Stabilität von Gallensäuren und Lösungen daraus zeigten auf, dass diese sehr beständig gegenüber pH-Wert, Temperatur und organischen Lösungsmitteln sind. Aus diesem Grund wurde auf eine Stabilitätsuntersuchung verzichtet^{199,203}.

Die biologischen Matrices (Fäzes, Plasma, Fettgewebe) und die Fermentationsproben wurden bis zur Probenaufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die aufgearbeiteten, in Methanol vorliegenden Proben, sowie die Standardlösungen wurden bis zur LC-MS/MS-Analyse bei -20 °C im Gefrierfach aufbewahrt. Nach dem Ablauf von 12 Monaten wurden alle Lösungen verworfen und frisch hergestellt.

2 Untersuchungen zum Einfluss von *Coriobacteriaceae* auf den Gallensäuren- und Lipidmetabolismus

2.1 In vitro-Fermentation

Die entwickelte LC-MS/MS-Methode wurde verwendet, um den Einfluss von 4 *Coriobacteriaceae*-Stämmen auf die Transformation von Gallensäuren zu untersuchen. Das Fermentationsexperiment wurde von Frau Sarah Just am ZIEL – Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung der Technischen Universität München durchgeführt.

2.1.1 Chemikalien und Bakterien

Chemikalien: siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.1.1.

Die Bakterienstämme *Collinsella aerofaciens* (*C. aerofaciens*) DSM 3979^T, *Enterorhabdus mucosicola* (*E mucosicola*) DSM 19490^T, *Eggerthella lenta* (*Egg. lenta*) DSM 2243^T und *Atopobium parvulum* (*A. parvulum*) DSM 20469^T wurden vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, DE) bezogen.

2.1.2 Experimentelles Design

Der erste Schritt in der bakteriellen Transformation von Gallensäuren stellt die Hydrolyse der Amidbindung durch das Enzym BSH dar, wodurch aus konjugierten Gallensäuren ihre freien Partner gebildet werden. Nur freie Gallensäuren können durch Dehydroxylierungs- und Dehydrierungsreaktionen weiter durch intestinale Bakterien umgewandelt und modifiziert werden.

Zwei konjugierte Gallensäuren, das Taurinderivat TCA und das Glycinkonjugat GCA, wurden eingesetzt um die BSH-Aktivität der vier selektierten *Coriobacteriaceae*-Stämme zu untersuchen. Neben diesem Enzym verfügen eine Reihe intestinaler Bakterien über HSDH-Enzyme, die an der stereospezifischen Oxidation und Epimerisierung der Hydroxylgruppen an Position C3, C7 und C12 des Sterankörpers beteiligt sind, wodurch stabile Oxointermediate gebildet werden.

Zellkulturnährmedium (MM, Minimal Medium) supplementiert mit Mausfäzes (verdünnt 50fach in MM) und reines Zellkulturnährmedium wurden auf die gleiche Weise behandelt und fungierten jeweils als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung (n = 3) durchgeführt. Die Stammkulturen (20%ig in Glycerol) wurden über Nacht bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen in Hungate-Röhrchen auf MM angezogen. Frische Übernachtkulturen wurden für die Beimpfung des Fermentationsmediums verwendet.

- Versuchsaufbau**
- 1.5 mL MM (enthält 1 mM w/v TCA und GCA) werden mit dem entsprechenden Bakterienstamm (1% v/v) beimpft und unter anaeroben Bedingungen (90% N₂, 10% H₂) bei 37 °C für 48 h inkubiert
 - 200 µL des MM werden in ein 96-well Plate überführt, sofort auf -80 °C abgekühlt und bei der gleichen Temperatur gelagert
 - Probenaufarbeitung: 20 µL MM werden mit 5 µL IS-Mix und 25 µL Methanol versetzt, Inkubation 10 min bei RT unter konstanten Schütteln
 - Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - Analyse des Überstandes mittel LC-MS/MS

2.1.3 Quantitative Bestimmung der Gallensäuren

2.1.3.1 Chemikalien

Siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.1.

2.1.3.2 Probenvorbereitung

Für die quantitative Analyse der Gallensäuren wurde das MM-Medium wie im Folgenden beschrieben aufgearbeitet:

- Zellkulturnährmedium**
- 5 µL Zellkulturnährmedium werden mit 5 µL IS-Mix versetzt und mit Methanol auf ein finales Volumen von 50 µL aufgefüllt
 - Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 30 µL Überstand abnehmen → LC-MS/MS-Analyse

2.1.3.3 Messmethode

Siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.2.2 Tabelle G-1.

2.1.3.4 Auswertung

Siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 2.2.3.4.

2.2 In vivo-Fütterungsstudie

Durch *in vitro*-Testsystemen lassen sich zwar einfache bis komplexe physiologische und biochemische Reaktionen repräsentieren, allerdings bleiben systemische und organspezifische Einflüsse unberücksichtigt. Um den Einfluss der vier intestinalen Bakterien auf den Fettstoffwechsel des Wirtes *in vivo* bewerten zu können, wurde daher ein Tierexperiment an Mäusen durchgeführt. Allerdings ist es aufgrund der Komplexität und Diversität der Darmmikrobiota schwer nachvollziehbar, welche physiologischen und biochemischen Prozesse von welchen Bakterienstämmen ausgeübt werden. Der gnotobiotische Ansatz bietet die Möglichkeit keimfreie Mäuse mit einzelnen Bakterienpezies zu kolonisieren, um gezielt Erkenntnisse über deren Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase sowie Informationen über die Interaktion zwischen intestinalen Bakterien und dem Wirt zu erhalten. Gnotobiotische Mäuse werden unter sterilen Bedingungen geboren und wachsen in einer keimfreien Umgebung auf²³⁷.

Das gesamte Tierexperiment wurde von Frau Sarah Just am ZIEL – Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung der Technischen Universität München durchgeführt.

2.2.1 Chemikalien und Bakterien

Chemikalien: siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.1.

Bakterien: siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 2.1.1.

2.2.2 Studiendesign

Männliche, keimfreie C57BL/6N Mäuse wurden fünf Wochen nach der Geburt mit vier dominanten *Coriobacteriaceae*-Stämmen ('*Corio*') besiedelt (vgl. Abbildung G-4). Nach weiteren fünf Wochen erfolgte eine randomisierte Einteilung in drei Gruppen (n = 12). Da die Ernährung einen großen Einfluss auf die Diversität und die Funktion der intestinalen Darmmikrobiota hat, war es ebenfalls von Interesse die Auswirkung von Nahrungsbestandteilen zu untersuchen.

Im Anschluss an eine zweiwöchige Konditionierungsphase, in der alle Mäuse ausschließlich mit einer Kontrolldiät (CD, *Control Diet*) gefüttert wurden, erfolgte eine Umstellung der Ernährung. Fortan wurden die Versuchstiere mit drei unterschiedlichen Diäten (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE): CD, Palmöl-basierte fettreiche Diät (HFD, *High Fat Diet*) und einer mit den Gallensäuren CA und CDCA (je 0.1%, w/w) supplementierten Kontrolldiät (BA, *Bile Acid Diet*) für weitere 16 Wochen gefüttert (je Gruppe n = 12). Die HFD wies einen wesentlich erhöhten Anteil an Fett und Kohlenhydraten auf, was sich in einer höheren Energiedichte im Vergleich zu CD und BA äußerte (siehe Abbildung G-3).

Keimfreie (GF, *Germfree*) sowie spezifisch pathogen-freie (SPF) Mäuse dienten als Kontrolle (vgl. Abbildung G-4). Die Keimfreiheit der Mäuse sowie der Erfolg der Kolonisierung wurden mit Hilfe von Kultivierung sowie einer 16S rRNA basierten qPCR überprüft. Mit der Vollendung der 26. Lebenswoche erfolgte die Entnahme folgender biologischer Proben: portales Plasma, Fettgewebe (mesenterial, subkutan & epididymal) und Caecum (Blinddarminhalt).

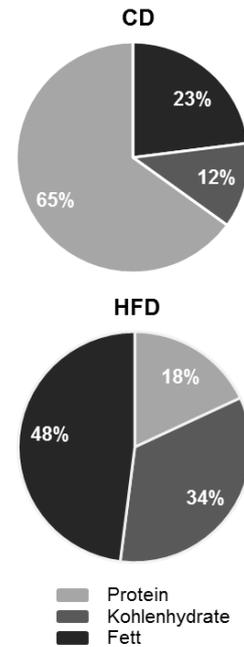


ABBILDUNG G-3 Zusammensetzung der verwendeten Diäten.

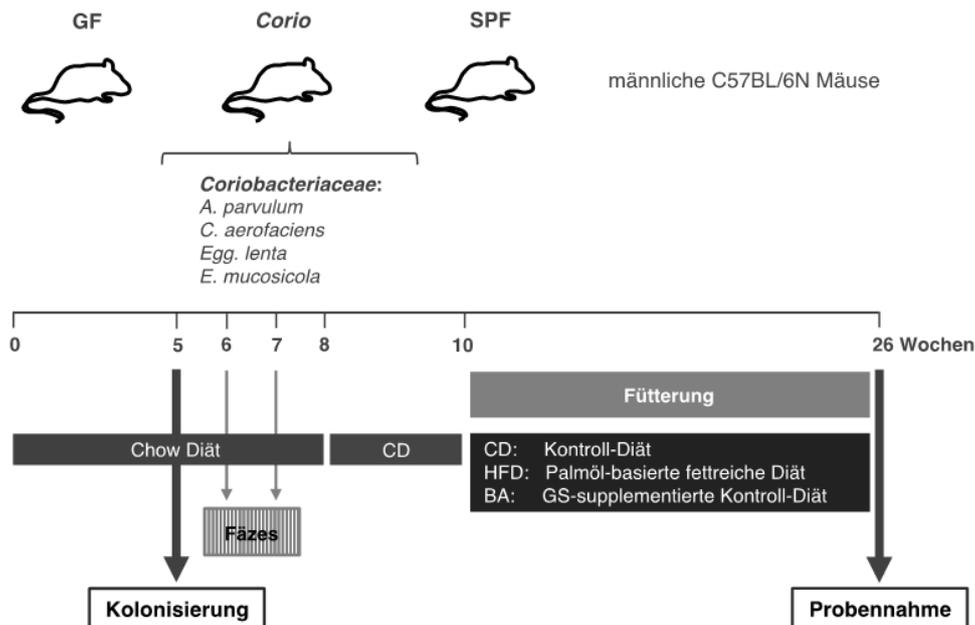


ABBILDUNG G-4 Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Untersuchung der metabolischen Adaption von *Coriobacteriaceae* und deren Einfluss auf den Gallensäuren- und Lipidstoffwechsel *in vivo*. (je Maus- bzw. Fütterungsgruppe: n = 12)

2.2.3 Quantitative Bestimmung von Gallensäuren

2.2.3.1 Chemikalien

Siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.1.

2.2.3.2 Probenvorbereitung

Mittels der entwickelten LC-MS/MS-Methode wurden die Gallensäureprofile für die verschiedenen biologischen Matrices ermittelt, die wie folgt für die Messung aufgearbeitet wurden:

- Plasma**
- 10-50 μL EDTA-Plasma werden mit 5 μL IS-Mix versetzt und mit Methanol auf ein finales Volumen von 150 μL aufgefüllt
 - Inkubation 10 min bei RT unter konstanten Schütteln
 - Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 125 μL Überstand abnehmen, in ein neues Messvial überführen und unter einem leichten N_2 -Strom zur Trockne einengen
 - Resuspension in 50 μL Methanol → LC-MS/MS-Analyse
- Caecum**
- 5 mg lyophilisiertes und fein gemörseretes Caecum werden in 200 μL Methanol suspendiert mit 50 μL IS-Mix versetzt
 - Inkubation 10 min bei RT unter konstanten Schütteln
 - Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 5 μL Überstand mit 45 μL Methanol vermischen → LC-MS/MS-Analyse
- Fettgewebe**
- zwischen 50 - 150 mg Fettgewebe werden mit 10 μL IS und 2 mL Methanol versetzt und der Ansatz mit einem Ultra-Turrax (Stufe 4, 3 x 20 sec) homogenisiert
 - Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 600 μL des Überstandes werden entnommen und unter einem leichten N_2 -Strom zur Trockne eingeengt
 - Rückstand wird in 50 μL Methanol aufgenommen → LC-MS/MS-Analyse

2.2.3.3 Messmethode

Siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.2.2 Tabelle G-1.

2.2.3.4 Auswertung

Zur Erzeugung einer linearen Regressionsgeraden wurde das Verhältnis aus Peakfläche des Analyten zum korrespondierenden IS ($A_{A \text{ Standard}}/A_{IS \text{ Standard}}$) gegen den Quotienten aus Konzentration des Analyten und Konzentration des IS ($c_{A \text{ Standard}}/c_{IS \text{ Standard}}$) im jeweiligen Standard aufgetragen. Die Berechnung der Probenkonzentration für Plasma [$\mu\text{mol/L}$] sowie Caecum und Fettgewebe [$\mu\text{g/g}$] erfolgte nach Gleichung (15):

$$c_{A \text{ Probe}} = \frac{c_{IS} \cdot \left(\frac{A_{A \text{ Probe}}}{A_{IS \text{ Probe}}} - b \right) \cdot V \cdot f \cdot (M)}{m \cdot E} \quad (15)$$

$c_{A \text{ Probe}}$	Konzentration des Analyten in der Untersuchungsprobe [$\mu\text{mol/L}$] bzw. [$\mu\text{g/g}$]
c_{IS}	Konzentration des IS in der Untersuchungsprobe [$\mu\text{mol/L}$]
$A_{A \text{ Probe}}$	Peakfläche des Analyten in der Untersuchungsprobe
$A_{IS \text{ Probe}}$	Peakfläche des korrespondierenden IS in der Untersuchungsprobe
b	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion
V	Volumen des Testansatzes [L]
f	Verdünnungsfaktor
M	Molare Masse des Analyten [g/mol]
m	Steigung der Kalibrierfunktion
E	Probeneinwaage [L] bzw. [g]

2.2.4 Quantitative Bestimmung von Fettsäuren in Fettgewebe

Fettsäuren vermitteln ebenso wie Gallensäuren über den G-Protein gekoppelten Rezeptor TGR5 und nukleäre Rezeptoren bzw. Farnesoid X Rezeptor (FXR) Signale zur Regulation wichtiger Stoffwechselwege, wie dem Fettstoffwechsel, Cholesterolfstoffwechsel und der Glukosehomöostase. Im Rahmen des Tierexperiments wurde mittels einer GC-FID-Applikation das freie Fettsäurespektrum in drei verschiedenen Fettgeweben (subkutan, mesenterial und epididymal) ermittelt.

2.2.4.1 Chemikalien

Interner Standard (IS):	Heptadecansäure (C17:0), 2 mg/mL in MTBE (Methyl- <i>tert</i> -butylether)
C19:0-Me-Lösung:	C19:0-Me (= Nonadecansäure-Methylester), 1 mg/mL in MTBE
FAME-Mix	C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:0, C18:1n9t, C18:1n9c, C18:2n6t, C18:2n6c, C18:3n6, C20:0, C18:3n3, C20:1n9, C21:0, C20:2, C22:0, C20:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3, C22:1n9, C22:2, C22:6n3, C23:0, C24:0 und C24:1n9

2.2.4.2 Probenaufarbeitung

Für die Bestimmung der Fettsäuren in Fettgewebe von Mäusen wurden die Proben nach folgendem Schema aufgearbeitet:

- Probenaufarbeitung**
- 10 - 50 mg Fettgewebe genau in ein Schnappdeckelglas einwiegen und mit 2 mL Methanol und 10 µL IS-Mix versetzen.
 - Mechanischer Anschluss mittels Ultra-Turrax (Stufe 4, 3 x 20 sec).
 - Lösung in ein 15-mL-Röhrchen überführen und den Ansatz zentrifugieren (4.000 rpm, 4 °C, 10 min)
 - 1000 µL der methanolischen Probenlösung werden mit 3 mL MTBE und 50 µL IS versetzt und abwechselnd 10 min bei RT im Ultraschallbad behandelt und 10 min auf dem Vortexer homogenisiert (2200 U/min). Der gesamte Schritt wird insgesamt 3x wiederholt.
 - Die organische Phase abnehmen und durch einen PTFE-Filter spritzenfiltrieren
 - 1.5 mL des Filtrats entnehmen, in ein Glasvial überführen und unter einem N₂-Strom bis zur Trockne einengen.
 - Den Rückstand in 150 µL MTBE aufnehmen, das Messvial mit einem Crimpdeckel verschließen, kurz vortexen und die Lösung in ein neues Messvial überführen.
 - Das benutzte Vial mit 150 µL MTBE nachspülen und organische Lösungen vereinigen.
 - Die gesammelte Lösung unter einem N₂-Strom zur Trockne einengen.
 - Den Rückstand in 50 µL C19:0-Me-Lösung (1 mg/mL) resuspendieren und mit 25 µL TMSH (Trimethylsulfoniumhydroxid) verestern.

2.2.4.3 Auswertung

Der Fettsäuregehalt c berechnet als Methylester wird nach folgender Formel (16) berechnet:

$$c = \frac{c_{IS} \cdot \left(\frac{A_{A \text{ Probe}}}{A_{IS \text{ Probe}}} \right) \cdot V \cdot f}{E} \quad (16)$$

c	Konzentration des Analyten in der Untersuchungsprobe [mg/g]
c_{IS}	Konzentration des IS in der Untersuchungsprobe [mg/mL]
$A_{A \text{ Probe}}$	Peakfläche des Analyten in der Untersuchungsprobe
$A_{IS \text{ Probe}}$	Peakfläche des korrespondierenden IS in der Untersuchungsprobe
V	Endvolumen
f	Verdünnungsfaktoren
E	Probeneinwaage [g]

2.2.4.4 Messmethode**TABELLE G-2 Chromatographiebedingungen und Geräteparameter der GC-FID-Methode.**

	Spezifikation				
Gaschromatograph	Hewlett Packhard HP 6890 Series GC System				
Mobile Phase	Stickstoff				
Flussrate	2 mL/min				
Säule	Agilent CP-SIL 88 (50 x 250 µm x 20 µm)				
Gradient	Step	°C/min	Next °C	Hold min	Runtime min
	Initial	-	90	2.00	2.00
	Ramp 1	15	150	0.00	6.67
	Ramp 2	3	180	0.00	16.67
	Ramp 3	30	230	10.00	28.34
Autosampler	Agilent 6890 Series Injector				
Injektortemperatur	200 °C				
Injektionsvolumen	1 µL				
Split	75:1				
Software	ChemStation von Agilent Version Rev.A.10.02 1757				
Integrationsvoraussetzung	Peaksteigung/ Empfindlichkeit: 15				
	mind. Peakbreite: 0.01				
	mind. Peakfläche: 2				
	mind. Peakhöhe: 2				

3 Statistik

3.1 Allgemeine statistische Analyse

Für die Datenerfassung wurde Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) verwendet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte sowohl mit der Software IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chigago, Illinois, USA) als auch mit SigmaPlot 12.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, DE).

Die Verteilung des empirisch gewonnenen Datenmaterials muss der Anforderung nach Normalverteilung nachkommen. Zur Überprüfung dieser Voraussetzung wurde der Anpassungstest nach KOLMOGOROV-SMIRNOV durchgeführt. Weiterhin müssen die Varianzen einer Population, denen die Stichprobe entnommen wurde, homogen verteilt sein. Diese Bedingung kann mit Hilfe des LEVENE-Test verifiziert werden, da dieser unempfindlich gegenüber einer Abweichung von der Normalverteilung ist²³⁸.

Wurde festgestellt, dass eine der beiden genannten Voraussetzungen nicht erfüllt wurde, so wurde versucht durch eine Logarithmus-Transformation der Messdaten die Normalität bzw. Varianzhomogenität herbeizuführen. Die normalverteilten, transformierten Daten wurden anschließend zur Analyse mit parametrischen Auswertungsmethoden verwendet.

Mit dem *students* t-Test für abhängige Stichproben (gepaarter t-Test) wurde für die Fermentationsstudie getestet, ob die empirisch bestimmten Mittelwerte der beiden verbundenen Stichproben (Zeitpunkt = 0 h bzw. 48 h) sich voneinander unterscheiden. Bei abhängigen Stichproben wird die Differenz der Messvariablen zwischen der ersten und der zweiten Messung gebildet. Da der Mittelwertsunterschied zwischen den beiden Gruppen in beide Richtungen gehen kann (größer bzw. kleiner), fand die zweiseitige Fragestellung Anwendung. *P*-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen.

Die Varianzanalyse (ANOVA, *Analysis of Variance*,) ist eine statistische Methode, die basierend auf dem F-Test die Signifikanz experimenteller Ergebnisse abschätzt. Sie beruht auf der Zerlegung der gesamten Variabilität eines Datensatzes in einzelne Komponenten, wobei der Einfluss unabhängiger Variablen auf abhängige Variable überprüft wird. Liegen in einem Versuch mehrere bekannte Faktoren (> 2) vor, gibt die mehrfaktorielle Varianzanalyse die Möglichkeit, die Gesamtvariabilität in die von verschiedenen Faktoren verursachten Streuungskomponenten zu zerlegen.

Bei der Zweiweg-ANOVA (*Two-Way-ANOVA*) gibt es zwei experimentelle Faktoren, die für jede experimentelle Gruppe variiert werden. Das Tierexperiment wurde an Mäusen, eingeteilt in drei verschiedene Haltungformen (Faktor „*Housing*“), die mit drei verschiedenen Diäten (Faktor „*Diet*“) gefüttert wurden, durchgeführt. Im Rahmen der zweifaktoriellen Varianzanalyse sollte auf Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen getestet werden, die auf Basis jedes einzelnen Faktors („*Diet*“, „*Housing*“) und der Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren („*Diet*“ x „*Housing*“) gruppiert sind. Bei einer Varianzanalyse wird lediglich festgestellt wird, dass signifikante Unterschiede zwischen den Messgruppen vorliegen. Welcher Messpunkt signifikant von den anderen differiert oder ob sich sogar alle drei signifikant voneinander unterscheiden kann durch eine zweifaktorielle ANOVA allein nicht beantwortet werden.

Daher sollte nach der Durchführung der Varianzanalyse ein multipler Mittelwerttests bzw. ein *Post-Hoc*-Verfahren angeschlossen werden. Im vorliegenden Fall wurde aus der vielfältigen Gruppe der *Post-Hoc*-Tests die HOLM-SIDAK-Methode ausgewählt. Im Gegensatz zu vergleichbaren *Post-Hoc*-Verfahren handelt es sich um einen leistungsstärkeren Test, der fähig ist, auch Unterschiede anzuzeigen, welche mit den anderen Verfahren unentdeckt bleiben würden. Die Mittelwertsummen werden miteinander verglichen. Sowohl für eine paarweise Gegenüberstellung als auch für Vergleiche mit Kontrollgruppen können die *P*-Werte bei der Methode nach HOLM-SIDAK-Test berechnet werden. Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0.05$ festgelegt.

3.2 Multivariate Datenanalyse

Aufgrund der Komplexität der Messdaten aus tierexperimentellen Studien lassen sich Abhängigkeiten und Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen nicht immer erkennen. Die multivariate Datenanalyse stellt ein potentes Hilfsmittel dar, gleichzeitig mehrere Einflussfaktoren in einer gemeinsamen Analyse gleichbedeutend zu untersuchen und somit Relationen zwischen einzelnen Variablen aufzudecken. Insgesamt ist das Ziel einer multivariaten Datenanalyse die signifikante Reduktion der Datendichte, um gezielt auf einen Blick relevante Informationen für die gegebene Fragestellung herauszufiltern. Strukturentdeckende Verfahren wie die Cluster- und Hauptkomponentenanalyse eignen sich besonders dazu, Zusammenhänge innerhalb der untersuchten Gruppen graphisch darzustellen²³⁹.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, *Principal Component Analysis*) ist ein Verfahren aus der multivariaten Faktoranalyse, welches zur Strukturierung und Reduktion komplexer Datensätze verwendet wird, in dem aus großen Datenmengen mit vielen Eigenschaften (= Ausgangsdaten) Variablen mit gleicher Information zu künstlichen Hauptkomponenten (PC, *Principal Component*) zusammengefasst werden. Hauptkomponenten können nicht direkt gemessen werden, enthalten jedoch mehr Informationen als jede Ausgangsvariable. Variablen, die untereinander stark variieren werden zu einem Faktor zusammengefasst. Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es, durch eine umfangreiche Datenreduktion die komplizierten Zusammenhänge zwischen den Daten durch möglichst wenige Variablen wiederzugeben^{240,241}.

Die PCA wird vor allem dazu angewandt, da sie eine bessere graphische Veranschaulichung der wesentlichen Strukturen des Datensatz erlaubt. Deshalb sollte die PCA auf den komplexen Datensatz des Tierexperiments angewandt werden, um Zusammenhänge und Interaktionen verschiedener Ausgangsvariablen in einer einfachen Form sichtbar zu machen und die Interpretation der Daten zu vereinfachen. Zum statistischen Rechnen und zur Erstellung der Graphiken wurde die online frei verfügbare Software „R“ for *Statistical Computing* (<http://cran.r-project.org>) verwendet.

Teil H – Literaturverzeichnis

- 1 Haller, D. & Hörmannspurger, G., *Darmgesundheit und Mikrobiota - Ein Überblick über die Bedeutung der Darmbakterien für die Gesundheit*, Springer Fachmedien, Wiesbaden, (2015).
- 2 Stamp, D. & Jenkins, G., *An Overview of Bile-Acid Synthesis, Chemistry and Function in Bile Acids: Toxicology and Bioactivity*, (G. Jenkins & L. J. Hardie), Chapter 1, Royal Society of Chemistry, London, (2008).
- 3 Hofmann, A. F. & Hagey, L. R., *Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics*. Cell Mol Life Sci, 65, 2461-83 (2008).
- 4 Hofmann, A. F. & Mysels, K. J., *Bile Salts as biological surfactants*. Colloids Surf., 30, 145-73 (1987).
- 5 Swann, J. R. *et al.*, *Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments*. PNAS, 108, 4523-30 (2011).
- 6 Devlin, A. S. & Fischbach, M. A., *A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids*. Nat Chem Biol, 11, 8 (2015).
- 7 Thomas, C. *et al.*, *Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases*. Nat Rev, 7, 678-93 (2008).
- 8 Stenman, L. K., Holma, R., Eggert, A. & Korpela, R., *A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 304, G227-G34 (2013).
- 9 Duboc, H. *et al.*, *Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases*. Gut, 62, 531-39 (2013).
- 10 Louis, P., Hold, G. L. & Flint, H. J., *The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer*. Nat Rev Microbiol., 12, 661-72 (2014).
- 11 Clavel, T., Lepage, P. & Charrier, C., *The Family Coriobacteriaceae in The Prokaryotes.* , 4th Edition, (E. Rosenberg *et al.*), 11, 201-38, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2014).
- 12 Forslund, K. *et al.*, *Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota*. Nature 528, 262-6 (2015).
- 13 Qin, J. *et al.*, *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. Nature 490, 55-60 (2012).
- 14 Zoetendal, E. G. *et al.*, *The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract*. Microb Ecol Health D, 13, 129-34 (2001).
- 15 Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I., *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annu Rev Nutr, 22, 283-307 (2002).
- 16 Xu, J. & Gordon, J. I., *Honor thy symbionts*. PNAS, 100, 10452-9 (2003).
- 17 Palmer, C. *et al.*, *Development of the Human Infant Intestinal Microbiota*. PloS Biol, 5, 1556-73 (2007).
- 18 Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R., *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract*. Am J Clin Nutr, 69, 1035S-45S (1999).
- 19 Kirjavainen, P. V. & Gibson, G. R., *Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota*. Ann Med, 31, 288-92 (1999).
- 20 Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. & Vigi, V., *Intestinal microflora in early infancy: composition and development*. Acta Paediatr Suppl, 91, 48-55 (2003).
- 21 Rodriguez, J. M. *et al.*, *The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life*. Microb Ecol Health D, 26, 1-17 (2015).

- 22 Blaut, M. & Clavel, T., *Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease*. J Nutr, 137, 5 (2007).
- 23 Gerritsen, J., Schmidt, H., Rijkers, G. T. & Vos, W. M. d., *Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics*. Genes Nutr, 6 (2011).
- 24 Clavel, T. et al., *Intestinal microbiota in metabolic diseases: From bacterial community structure and functions to species of pathophysiological relevance*. Gut Microbes, 5, 544-51 (2014).
- 25 Ley, R. E., Peterson, D. A. & Gordon, J. I., *Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine*. Cell, 124, 837-48 (2006).
- 26 Nicholson, J. K. et al., *Host-gut microbiota metabolic interactions*. Science, 336, 1262-7 (2012).
- 27 Marchesi, J. R. et al., *The gut microbiota and host health: a new clinical frontier*. Gut 65, 330-39 (2016).
- 28 Bäckhed, F. et al., *Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine*. Science, 307, 1915-19 (2005).
- 29 Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfey, L. W. & Knight, R., *The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View*. Cell, 148, 1258-70 (2012).
- 30 Neish, A. S., *Microbes in Gastrointestinal Health and Disease*. Gastroenterology, 136, 65-80 (2009).
- 31 Ley, R. E. et al., *Evolution of mammals and their gut microbes*. Science, 320, 1647-51 (2008).
- 32 MacDonald, T. T. & Monteleone, G., *Immunity, inflammation, and allergy in the gut*. Science, 307, 1920-5 (2005).
- 33 Tannock, G. W., *Molecular assessment of intestinal microflora*. Am J Clin Nutr, 73, 410S-4S (2001).
- 34 Chassard, C. & Lacroix, C., *Carbohydrates and the human gut microbiota*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 16 (2013).
- 35 Macfarlane, S. & Macfarlane, G. T., *Regulation of short-chain fatty acid production*. Proc Nutr Soc, 62, 67-72 (2003).
- 36 Scott, K. P. et al., *The influence of diet on the gut microbiota*. Pharmacol Res, 69, 52-60 (2013).
- 37 Gérard, P. et al., *Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying cholesterol-to-coprostanol conversion*. FEMS Microbiol Ecol, 47, 337-43 (2004).
- 38 Arora, T. & Bäckhed, F., *The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives*. J Intern Med, 280, 339-49 (2016).
- 39 Louis, P., Scott, K. P., Duncan, S. H. & Flint, H. J., *Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine*. J Appl Microbiol, 102, 1197-208 (2007).
- 40 Macfarlane, G. T., Cummings, J. H. & Allison, C., *Protein degradation by human intestinal bacteria*. J Gen Microbiol, 132, 1647-56 (1986).
- 41 Smith, E. A. & Macfarlane, G. T., *Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism*. J Appl Bacteriol, 81, 288-302 (1996).
- 42 Hill, M. J., *Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis*. Eur J Cancer Prev, 1, S45-5 (1997).
- 43 Allison, M. J. et al., *Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans*. J Nutr, 116, 455-60 (1986).

- 44 Ussar, S. *et al.*, *Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome*. *Cell Metabolism*, 22, 516-30 (2015).
- 45 Guarner, F. & Malagelada, J. R., *Gut flora in health and disease*. *Lancet*, 361, 512-9 (2003).
- 46 DiBaise, J. K. *et al.*, *Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity*. *Mayo Clin Proc*, 83, 460-9 (2008).
- 47 Tsai, F. & Coyle, W. J., *The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora?* *Curr Gastroenterol Rep*, 11, 307-13 (2009).
- 48 Larsen, N. *et al.*, *Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults*. *PloS ONE*, 5 (2010).
- 49 Schaubeck, M. *et al.*, *Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence*. *Gut*, 0, 1-13 (2015).
- 50 Manichanh, A. *et al.*, *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. *Gut*, 55, 205-11 (2006).
- 51 Round, J. L. & Mazmanian, S. K., *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 9, 313-23 (2009).
- 52 Fujimura, K. E., Slusher, N. A., Cabana, M. D. & Lynch, S. V., *Role of the gut microbiota in defining human health*. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 8, 435-54 (2010).
- 53 Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I., *Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity*. *Nature*, 444, 1022-3 (2006).
- 54 Cani, P. D. & Delzenne, N. M., *Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota*. *Curr Opin Pharmacol*, 9, 737-43 (2009).
- 55 Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. & Gordon, a. J. I., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. *PNAS*, 104, 6 (2007).
- 56 Bäckhed, F. *et al.*, *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. *PNAS*, 101, 15718-23 (2004).
- 57 Le Chatelier, E. *et al.*, *Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers*. *Nature*, 500, 541-6 (2013).
- 58 Turnbaugh, P. J. *et al.*, *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. *Nature*, 444, 1027-31 (2006).
- 59 Zhang, C. *et al.*, *Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations*. *ISME Journal*, 6, 1848-57 (2012).
- 60 Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I., *Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome*. *Cell Host & Microbe*, 3, 213-23 (2008).
- 61 Turnbaugh, P. J. *et al.*, *The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice*. *Sci Transl Med*, 1, 1-19 (2009).
- 62 Diamant, M., Blaak, E. E. & Vos, W. M. d., *Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?* *Obes Rev.*, 12, 272-81 (2011).
- 63 Canani, R. B. *et al.*, *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. *World J Gastroenterol*, 17, 1519-28 (2011).
- 64 Liévin-LeMoal, V. & Servin, A. L., *The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota*. *Clin Microbiol Rev*, 19, 315-37 (2006).

- 65 Adlerberth, I. *et al.*, *Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract*. *Microb Ecol Health Dis*, 2, 223-39 (2000).
- 66 Ulluwishewa, D. *et al.*, *Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components*. *J Nutr*, 141, 769-76 (2011).
- 67 Turner, J. R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 9, 799-809 (2009).
- 68 Selsted, M. E. & Ouellette, A. J., *Mammalian defensins in the antimicrobial immune response*. *Nat Immunol*, 6, 551-7 (2005).
- 69 Clavel, T. & Haller, D., *Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation*. *Curr Issues Intest Microbiol*, 8, 25-43 (2007).
- 70 Brestoff, J. R. & Artis, D., *Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system*. *Nature Immunol.*, 14, 676-84 (2013).
- 71 Brandtzaeg, P. *et al.*, *Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes*. *Gastroenterology*, 97, 1562-84 (1989).
- 72 Macpherson, A. J. & Uhr, T., *Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria*. *Science*, 303, 1662-5 (2004).
- 73 Turnbaugh, P. J., *Fat, bile and gut microbes*. *Nature*, 487, 47-8 (2012).
- 74 Claus, S. P. *et al.*, *Colonization-Induced Host-Gut Microbial Metabolic Interaction*. *MBio*, 2, e00271-10 (2011).
- 75 Martínez, I. *et al.*, *Diet-Induced Metabolic Improvements in a Hamster Model of Hypercholesterolemia Are Strongly Linked to Alterations of the Gut Microbiota*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 4175-84 (2009).
- 76 Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L., *Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actino bacteria classis nov.* *Int J Syst Bacteriol*, 47, 479-91 (1997).
- 77 Ridlon, J. M., Kang, D. J. & Hylemon, P. B., *Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria*. *J Lip Res*, 47, 241-59 (2006).
- 78 Bokkenheuser, V. D., Winter, J., Dehazya, P. & Kelly, W. G., *Isolation and Characterization of Human Fecal Bacteria Capable of 21-Dehydroxylating Corticoids*. *Appl Environ Microbiol*, 34, 571-5 (1977).
- 79 Clavel, T., Dore, J. & Blaut, M., *Bioavailability of lignans in human subjects*. *Nutr Res Rev*, 19, 187-96 (2006).
- 80 Mabrok, H. B. *et al.*, *Lignan transformation by gut bacteria lowers tumor burden in a gnotobiotic rat model of breast cancer*. *Carcinogenesis*, 33, 203-8 (2012).
- 81 Qin, J. *et al.*, *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *Nature*, 464, 59-67 (2010).
- 82 Kageyama, A. & Benno, Y., *Emendation of genus Collinsella and proposal of Collinsella stercoris sp. nov. and Collinsella intestinalis sp. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 1767-74 (2000).
- 83 Clavel, T. *et al.*, *Isolation of bacteria from the ileal mucosa of TNFdeltaARE mice and description of Enterorhabdus mucosicola gen. nov., sp. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, 1805-12 (2009).
- 84 Matthies, A. *et al.*, *Conversion of Daidzein and Genistein by an Anaerobic Bacterium Newly Isolated from the Mouse Intestine*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 4847-52 (2008).

- 85 Clavel, T. & Mapesa, J. O., *Phenolics in Human Nutrition: Importance of the Intestinal Microbiome for Isoflavone and Lignan Bioavailability in Handbook of Natural Products*, (K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon), 2433-63, Springer Berlin Heidelberg, (2013).
- 86 Gleason, C. E. et al., *A preliminary study of the safety, feasibility and cognitive efficacy of soy isoflavone supplements in older men and women*. Age and Ageing, 38, 86-93 (2009).
- 87 Rajilić-Stojanović, M. & Vos, W. M. d., *The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota*. FEMS Microbiol Rev, 38, 996-1047 (2014).
- 88 Clavel, T. et al., *Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women*. J Nutr, 135, 2786-92 (2005).
- 89 Russell, D. W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis*. Annu Rev Biochem, 72, 137-74 (2003).
- 90 Vallim, T. Q. d. A., Tarling, E. J. & Edwards, P. A., *Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism*. Cell Metabolism, 17, 657-69 (2013).
- 91 Chiang, J. Y. L., *Bile acids: regulation of synthesis*. J Lip Res, 50, 1955-66 (2009).
- 92 Chiang, J. Y. L., *Regulation of Bile Acid Synthesis*. Front Biosci., 15, 176-93 (1998).
- 93 Hofmann, A. F., *Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly*. News Physiol Sci, 14, 24-9 (1999).
- 94 Sayin, S. I. et al., *Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist*. Cell Metabolism, 17, 225-35 (2013).
- 95 Hofmann, A. F., *Chemistry and Enterohepatic Circulation of Bile Acids*. Hepatology, 4, 45-14S (1984).
- 96 Stieger, B., Meier, Y. & Meier, P. J., *The bile salt export pump*. Eur J Physiol, 435, 611-20 (2007).
- 97 Wood, J. R. & Svanvik, J., *Gall-bladder water and electrolyte transport and its regulation*. Gut, 24, 579-93 (1983).
- 98 Hofmann, A. F., *The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease*. Arch Intern Med, 169, 2647-58 (1999).
- 99 Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., *Chemistry and biology of bile acids*. Current Science, 87, 1666-83 (2004).
- 100 Zwicker, B. L. & Agellon, J. B., *Transport and biological activities of bile acids*. Int J Biochem Cell Biol, 45, 1389-98 (2013).
- 101 Dawson, P. A., *Bile Secretion an the Enterohepatic Circulation in Gastrointestinal and Liver Disease*, Volume 1, (M. Feldman et al.), 64, Saunders Elsevier, Philadelphia, (2010).
- 102 DeBoever, P. et al., *Protective effect of the bile salt hydrolase-active Lactobacillus reuteri against bile salt cytotoxicity*. Appl Microbiol Biotechnol, 53, 709-14 (2000).
- 103 Schmucker, D. L. et al., *Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events*. Hepatology, 12, 1216-21 (1990).
- 104 Patel, T., Bronk, S. F. & Gores, G. J., *Increases of Intracellular Magnesium Promote Glycodeoxycholate-induced Apoptosis in Rat Hepatocytes*. J Clin Invest, 94, 2183-92 (1994).
- 105 Trauner, M. & Halilbasic, E., *Nuclear Receptors as New Perspective for the Management of Liver Diseases*. Gastroenterology, 140, 1120-5 (2011).
- 106 Hofmann, A. F., *Bile Acids: Trying to Understand Their Chemistry and Biology with the Hope of Helping Patients*. Hepatology, 49, 16 (2009).

- 107 Stinton, L. M. & Shaffer, E. A., *Epidemiology of Gallbladder Disease: Cholelithiasis and Cancer*. Gut and Liver, 6, 172-87 (2012).
- 108 Ishizaki, K., Imada, T. & Tsurufuji, M., *Hepatoprotective bile acid 'ursodeoxycholic acid (UDCA)' Property and difference as bile acids*. Hepatol Res, 33, 174-7 (2005).
- 109 Zhao, X. M., Monet, A. M. & Montet, J. C., *β muricholic acid: a new hepatoprotective agent*. J Nutr Biochem, 4, 105-12 (1993).
- 110 Milkiewicz, P., Roma, M. G., Elias, E. & Coleman, R., *Hepatoprotection with tauroursodeoxycholate and β -muricholate against tauroolithocholate induced cholestasis: involvement of signal transduction pathways*. Gut, 51, 113-9 (2002).
- 111 Cook, J. W., Kennaway, E. L. & Kennaway, N. M., *Production of tumors in mice by deoxycholic acid*. Nature 145, 627 (1940).
- 112 Torre, L. A. et al., *Global Cancer Statistics, 2012*. Ca Cancer J Clin, 65, 87-108 (2015).
- 113 Degirolamo, C., Modica, S., Palasciano, G. & Moschetta, A., *Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors*. Trends Mol Med, 10, 564-72 (2011).
- 114 Bernstein, C., Payne, C. M. & Bernstein, H., *Bile Acids: Promoters or Carcinogens in Colon Cancer?* J Carcinogene Mutagene, 2, 1-2 (2011).
- 115 Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C. M. & Dvorak, K., *Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer*. World J Gastroenterol, 15, 3329-40 (2009).
- 116 Hofmann, A. F., *Detoxification of Lithocholic Acid, A Toxic Bile Acid: Relevance to Drug Hepatotoxicity*. Drug Met Review, 36, 703-22 (2004).
- 117 McGarr, S. E., Ridlon, J. M. & Phillip B. Hylemon. *Diet, Anaerobic Bacterial Metabolism, and Colon Cancer - A Review of the Literature*. J Clin Gastroenterol, 39, 98-109 (2005).
- 118 Im, E. & Martinez, J. D., *Ursodeoxycholic Acid (UDCA) Can Inhibit Deoxycholic Acid (DCA)-induced Apoptosis via Modulation of EGFR/Raf-1/ERK Signaling in Human Colon Cancer Cells*. J Nutr, 134, 483-6 (2004).
- 119 Bernstein, C. et al., *Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid*. Arch Toxicol, 85, 863-71 (2011).
- 120 Ou, J. et al., *Association between low colonic short-chain fatty acids and high bile acids in high colon cancer risk populations*. Nutr Cancer, 64, 34-40 (2012).
- 121 Latta, R. K. et al., *Toxicity of bile acids to colon cancer cell lines*. Cancer Lett, 70, 167-73 (1993).
- 122 Giovannucci, E. et al., *Intake of Fat, Meat, and Fiber in Relation to Risk of Colon Cancer in Men*. Cancer Res, 54, 2390-7 (1994).
- 123 Bostick, R. M. et al., *Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States)*. Cancer Causes and Control, 5, 38-52 (1994).
- 124 Willett, W. C. et al., *Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women*. N Engl J Med, 323, 1664-72 (1990).
- 125 Slattery, M. L. et al., *Eating Patterns and Risk of Colon Cancer*. Am J Epidemiol, 148, 4-16 (1998).
- 126 Prawitt, J., Caron, S. & Staels, B., *Bile Acid Metabolism and the Pathogenesis of Type 2 Diabetes*. Curr Diab Rep, 11, 160-6 (2011).
- 127 Hylemon, P. B. et al., *Bile acids as regulatory molecules*. J Lip Res, 50, 1509-20 (2009).
- 128 Houten, S. M., Watanabe, M. & Auwerx, J., *Endocrine functions of bile acids*. EMBO J, 25, 1419-25 (2006).

- 129 Holt, J. A. *et al.*, *Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis*. *Genes Dev.*, 17, 1581-91 (2003).
- 130 Ding, L., Yang, L., Wang, Z. & Huang, W., *Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5, 135-44 (2015).
- 131 Vlahcevic, Z. R., Heuman, D. M. & Hylemon, P. B., *Regulation of bile acid synthesis*. *Hepatology*, 13, 590-600 (1991).
- 132 Claudel, T., Staels, B. & Kuipers, F., *The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 2020-30 (2005).
- 133 Lefebvre, P. *et al.*, *Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation*. *Physiol Rev*, 89, 147-91 (2009).
- 134 Bishop-Bailey, D., Walsh, D. T. & Warner, T. D., *Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature*. *PNAS*, 101, 3668-73 (2004).
- 135 Claudel, T. *et al.*, *Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element*. *J Clin Invest*, 109, 961-71 (2002).
- 136 Goodwin, B. *et al.*, *A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis*. *Molecular Cell*, 6, 517-26 (2000).
- 137 Schwarz, M., Russell, D. W., Dietschy, J. M. & Turley, S. D., *Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 α -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia*. *J Lip Res*, 39, 1833-43 (1998).
- 138 Beigneux, A., Hofmann, A. F. & Young, S. G., *Human CYP7A1 deficiency: progress and enigmas*. *J Clin Invest*, 110, 29-31 (2002).
- 139 Pullinger, C. R. *et al.*, *Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype*. *J Clin Invest*, 110, 109-17 (2002).
- 140 Fang, S. *et al.*, *Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance*. *Nature Medicine*, 21, 9 (2015).
- 141 E. Neimark, Chen, F. & Shneider, B. L., *Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter*. *Hepatology*, 40, 146-56 (2004).
- 142 Nakahara, M. *et al.*, *Ileal Bile Acid-binding Protein, Functionally Associated with the Farnesoid X Receptor or the Ileal Bile Acid Transporter, Regulates Bile Acid Activity in the Small Intestine*. *J Biol Chem*, 250, 42283-89 (2005).
- 143 Watanabe, M. *et al.*, *Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c*. *J Clin Invest*, 113, 1408-18 (2004).
- 144 Wang, B. *et al.*, *Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease*. *Scientific Reports*, 6, 1-11 (2016).
- 145 Wree, A. *et al.*, *From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 10, 627-36 (2013).
- 146 Fuchs, M., *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Bile Acid-Activated Farnesoid X Receptor as an Emerging Treatment Target*. *J Lipids*, 2012, 1-8 (2012).
- 147 Kaur, A. *et al.*, *Loss of Cyp8b1 Improves Glucose Homeostasis by Increasing GLP-1*. *Diabetes* 64, 1168-79 (2015).
- 148 Lew, J.-L. *et al.*, *The Farnesoid X Receptor Controls Gene Expression in a Ligand- and Promoter-selective Fashion*. *J Biol Chem*, 279, 8856-61 (2004).
- 149 Wang, H. *et al.*, *Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR/BAR*. *Molecular Cell*, 3, 543-53 (1999).

- 150 Mudalier, S. *et al.*, *Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Gastroenterology*, 145, 574-82 (2013).
- 151 Zhang, S., Pan, X. & Jeong, H., *GW4064, an Agonist of Farnesoid X Receptor, Represses CYP3A4 Expression in Human Hepatocytes by Inducing Small Heterodimer Partner Expression*. *Drug Metab Dispos*, 43, 743-8 (2015).
- 152 Baranowski, M., *Biological role of liver X receptor*. *J Physiol Pharmacol*, 59, 31-55 (2008).
- 153 Zhao, C. & Dahlmann-Wright, K., *Liver X receptor in cholesterol metabolism*. *J Endocrinol*, 204, 233-40 (2010).
- 154 Schultz, J. R. *et al.*, *Role of LXRs in control of lipogenesis*. *Genes Dev.*, 14, 2831-38 (2000).
- 155 Mitro, N. *et al.*, *The nuclear receptor LXR is a glucose sensor*. *Nature* 445, 219-23 (2007).
- 156 Venkateswaran, A. *et al.*, *Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α* . *PNAS*, 97, 12097-102 (2000).
- 157 Kuipers, F., Bloks, V. W. & Groen, A. K., *Beyond intestinal soap - bile acids in metabolic control*. *Nature Rev Endocrinol.*, 10, 488-98 (2014).
- 158 Duboc, H., Tachéa, Y. & Hofmann, A. F., *The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application*. *Dig Liv Dis*, 46, 302-12 (2014).
- 159 Kawamata, Y. *et al.*, *A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids*. *J Biol Chem*, 278, 9435-40 (2003).
- 160 Watanabe, M. *et al.*, *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. *Nature* 439, 484-9 (2006).
- 161 Thomas, C. *et al.*, *TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis*. *Cell Metabolism*, 10, 167-77 (2009).
- 162 Maruyama, T. *et al.*, *Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)*. *Biochem Bioph Res Co*, 298, 714-19 (2002).
- 163 Keitel, V. *et al.*, *The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders*. *Hepatology*, 50, 861-70 (2009).
- 164 Gérard, P., *Metabolism of Cholesterol and Bile Acids by the Gut Microbiota*. *Pathogens*, 3, 14-24 (2014).
- 165 Batta, A. K. *et al.*, *Side Chain Conjugation Prevents Bacterial 7-Dehydroxylation of Bile Acids*. *J Biol Chem*, 265, 1025-28 (1990).
- 166 Begley, M., Hill, C. & Gahan, C. G. M., *Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 1729-38 (2006).
- 167 Eldere, J. v. *et al.*, *Tauroconjugation of Cholic Acid Stimulates 7 α -Dehydroxylation by Fecal Bacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 62, 656-61 (1996).
- 168 Smet, I. d. *et al.*, *In Vitro Study of Bile Salt Hydrolase (BSH) Activity of BSH Isogenic Lactobacillus plantarum 80 Strains and Estirnatign of Cholesterol Liwering through Enhanced BSH Activity*. *Microb Ecol Health D*, 7, 315-29 (1994).
- 169 Carey, M. C. & Small, D. M., *The Physical Chemistry of Cholesterol Solubility in Bile*. *J Clin Invest*, 61, 998-1026 (1978).
- 170 Marteau, P. *et al.*, *Metabolism of Bile Salts by Alimentary Bacteria During Transit in the Human Small Intestine*. *Microb Ecol Health D*, 8, 151-7 (1995).
- 171 Sutherland, J. D. & Macdonald, I. A., *The metabolism of primary, 7-oxo, and 7 β -hydroxy bile acids by Clostridium absonum*. *J Lip Res*, 23, 726-32 (1982).

- 172 Batta, A. K., Salen, G. & Shefer, S., *Transformation of bile acids into iso-bile acids by Clostridium perfringens: possible transport of 3 beta-hydrogen via the coenzym.* Hepatology, 5, 1126-31 (1985).
- 173 Batta, A. K., Aggarwal, A. K., Salen, G. & Shefer, S., *Selective reduction of oxo bile acids: synthesis of 3 α -, 7 β -, and 12 β -hydroxy bile acids.* J Lip Res, 32, 977-83 (1991).
- 174 Heuman, D. M. et al., *Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. In vivo studies in the rat.* Gastroenterology, 1, 203-11 (1991).
- 175 Sherrod, J. A. & Hylemon, P. B., *Partial purification and characterization of NAD-dependent 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from Bacteroides thetaiotaomicron.* Biochim Biophys Acta 486, 351-8 (1977).
- 176 Scalia, S., *Bile acid separation.* J Chromatogr B, 671, 299-317 (1995).
- 177 Griffiths, W. J. & Sjövall, J., *Bile acids: analysis in biological fluids and tissues.* J Lipid Res, 51, 23-41 (2010).
- 178 Roda, A., Piazza, F. & Baraldini, M., *Separation techniques for bile salts analysis.* J Chrom B, 717, 263-78 (1998).
- 179 Ferri, T., Campanella, L. & Angelis, G. d., *Differential-pulse polarographic determination of cholic acids.* The Analyst, 109, 923 (1984).
- 180 Murphy, G. M., Billing, B. H. & Baron, D. N., *A fluorimetric and enzymatic method for the estimation of serum total bile acids.* J Clin Path, 23, 594-8 (1970).
- 181 Turley, S. D. & Dietschy, J. M., *Re-evaluation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile.* J Lip Res, 19, 924-8 (1978).
- 182 Zhang, G.-H. et al., *An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase.* Biochem Biophys Res Commun, 326, 87-92 (2005).
- 183 Schölmerich, J., Roda, A. & DeLuca, M., *Bioluminescence assay using immobilized enzymes in bile acid analysis in The Bile Acids, Chemistry, Physiology, and Metabolism, Volume 4: Methods and Applications, (K. D. R. Setchell et al.), 7, 315-40, Plenum Press, New York, (1988).*
- 184 Pyka, A., *TLC of Selected Bile Acids: Detection and Separation.* J Liq Chromatogr Relat Technol, 31, 1373-85 (2008).
- 185 Chavez, M. N. & Krone, C. L., *Silicic acid thin-layer chromatography of conjugated and free bile acids.* J Lip Res, 17, 545-7 (1976).
- 186 Keller, S. & Jahreis, G., *Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in faeces.* J Chromatogr B, 813, 199-207 (2004).
- 187 Batta, A. K. et al., *Characterization of serum and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: effect of ursodeoxycholic acid treatment.* J Lip Res, 30, 1953-62 (1989).
- 188 Sjövall, J. & Setchell, K. D., *Techniques for extraction and group separation of bile acids in The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism, (K. D. Setchell et al.), 1-42, Plenum Press, New York, (1988).*
- 189 Gatti, R. et al., *HPLC-Fluorescence Determination of Individual Free and Conjugated Bile Acids in Human Serum.* Biomed Chromatogr, 11, 11-5 (1997).

- 190 Roda, A. *et al.*, *Determination of free and amidated bile acids by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering mass detection*. *J Lip Res*, 33, 1393-402 (1992).
- 191 Sardella, R. *et al.*, *HPLC/ELSD analysis of amidated bile acids: An effective and rapid way to assist continuous flow chemistry processes*. *Talanta*, 100, 364-71 (2012).
- 192 Torchia, E. C., Labonte, E. D. & Agellon, L. B., *Separation and Quantitation of Bile Acids Using an Isocratic Solvent System for High Performance Liquid Chromatography Coupled to an Evaporative Light Scattering Detector*. *Anal Biochem*, 298, 293-8 (2001).
- 193 Alnouti, Y., Csanaky, I. L. & Klaassen, C. D., *Quantitative-Profiling of Bile Acids and their Conjugates in Mouse Liver, Bile, Plasma, and Urine Using LC-MS/MS*. *J Chromatogr B*, 873, 209-20 (2008).
- 194 Ye, L. *et al.*, *High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy*. *J Chrom B*, 860, 10-7 (2007).
- 195 John, C. *et al.*, *A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids*. *J Chrom A*, 1371, 184-95 (2014).
- 196 Peaston, B., *Die Tandem-Massenspektrometrie in der klinischen Diagnostik*. *DIALOG*, 1, 1-3 (2010).
- 197 Ando, M. *et al.*, *High sensitive analysis of rat serum bile acids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *J Pharm Biomed Anal*, 40, 1179-86 (2006).
- 198 Burkard, I., von Eckardstein, A. & Rentsch, K. M., *Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B*, 826, 147-59 (2005).
- 199 Haag, M. *et al.*, *Quantitative bile acid profiling by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry: monitoring hepatitis B therapy by a novel Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide inhibitor*. *Anal Bioanal Chem*, 407, 6815-25 (2015).
- 200 Cai, X. *et al.*, *An LC-ESI-MS method for the quantitative analysis of bile acids composition in fecal materials*. *Biomed Chromatogr*, 26, 101-8 (2012).
- 201 Sarafian, M. H. *et al.*, *Bile Acid Profiling and Quantification in Biofluids Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. *Anal Chem*, 87, 9662-70 (2015).
- 202 Hagio, M. *et al.*, *Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS*. *J Lipid Res*, 50, 173-80 (2009).
- 203 Huang, J., Bathena, S. P., Csanaky, I. L. & Alnouti, Y., *Simultaneous characterization of bile acids and their sulfate metabolites in mouse liver, plasma, bile, and urine using LC-MS/MS*. *J Pharm Biomed Anal*, 55, 1111-9 (2011).
- 204 Luo, L. *et al.*, *Evaluation of Serum Bile Acid Profiles as Biomarkers of Liver Injury in Rodents*. *Toxicological Sciences*, 137, 12-25 (2013).
- 205 Tagliacozzi, D. *et al.*, *Quantitative Analysis of Bile Acids in Human Plasma by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry: A Simple and Rapid One-Step Method*. *Clin Chem Lab Med*, 41, 1633-41 (2003).
- 206 Hua, Y. & Jenke, D., *Increasing the sensitivity of an LC-MS method for screening material extracts for organic extractables via mobile phase optimization*. *J Chromatogr Sci*, 50, 213-27 (2012).

- 207 Perwaiz, S. *et al.*, *Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. *J Lip Res*, 42, 114-9 (2001).
- 208 Yang, Y., Griffiths, W. J., Nazer, H. & Sjövall, J., *Analysis of Bile Acids and Bile Alcohols in Urine by Capillary Column Liquid Chromatography– Mass Spectrometry using Fast Atom Bombardment or Electrospray Ionization and Collision-induced Dissociation*. *Biomed Chromatogr*, 11, 240-55 (1997).
- 209 Bobeldijk, I. *et al.*, *Quantitative profiling of bile acids in biofluids and tissues based on accurate mass high resolution LC-FT-MS: compound class targeting in a metabolomics workflow*. *J Chrom B*, 871, 306-13 (2008).
- 210 Scherer, M., Gnewuch, C., Schmitz, G. & Liebisch, G., *Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *J Chrom B*, 877, 3920-25 (2009).
- 211 Avery, M. J., *Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods*. 17, 197-201 (2003).
- 212 Duxbery, K., Owen, L., Gillingwater, S. & Keevil, B., *Naturally occurring isotopes of an analyte can interfere with doubly deuterated internal standard measurement*. *Ann Clin Biochem*, 45, 210-2 (2008).
- 213 Hennion, M.-C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. *J Chrom A*, 856, 3-54 (1999).
- 214 Simpson, N. J. K. & Wells, M. J., *Introduction to Solid-Phase Extraction in Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Application*, (N. J. K. Simpson), Chapter 1, 1-18, CRC Press, New York, (2000).
- 215 McDonald, J. G., Thompson, B. M., McCrum, E. C. & Russell, D. W., *Extraction and Analysis of Sterols in Biological Matrices by High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Methods Enzymol*, 432, 145-69 (2007).
- 216 Kromidas, S., *Validierung in der Analytik - Validierung in der Analytik*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, (1999).
- 217 U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*, (2001).
- 218 Deutsches Institut für Normierung, *DIN 32645: Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*, (2008).
- 219 Martínez, I. *et al.*, *Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters*. *Appl Environ Microbiol*, 79, 516-24 (2013).
- 220 Odermatt, A. *et al.*, *Hepatic reduction of the secondary bile acid 7-oxolithocholic acid is mediated by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1*. *Biochem J*, 436, 621-9 (2011).
- 221 Hamilton, J. P. *et al.*, *Human cecal bile acids: concentration and spectrum*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G256-G63 (2007).
- 222 Isomaa, B. *et al.*, *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome*. *Diabetes Care*, 24, 683-9 (2001).
- 223 Wang, C.-Y. & Liao, J. K., *A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance*. *Methods Mol Biol.*, 821, 421-33 (2012).
- 224 Rabot, S. *et al.*, *High fat diet drives obesity regardless the composition of the gut microbiota in mice*. *Scientific Reports*, 6, 1-11 (2016).

- 225 Caron-Jobin, M. *et al.*, *Stearic acid content of abdominal adipose tissues in obese women*. *Nutr Diabetes*, 2 (2012).
- 226 Jo, J. *et al.*, *Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth*. *PLoS Comput Biol*, 5, e1000324 (2009).
- 227 Stern, J. S. *et al.*, *Adipose-cell size and immunoreactive insulin levels in obese and normal-weight adults*. *Lancet*, 4, 948-51 (1972).
- 228 Salans, L. B., Knittle, J. L. & Hirsch, J., *The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity*. *J Clin Invest*, 47, 153-65 (1968).
- 229 Markova, M. *et al.*, *Isocaloric Diets High in Animal or Plant Protein Reduce Liver Fat and Inflammation in Individuals With Type 2 Diabetes*. *Gastroenterology*, 152, 571-85 (2017).
- 230 Marteau, P. *et al.*, *Comparative Study of Bacterial Groups within the Human Cecal and Fecal Microbiota*. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4939-42 (2001).
- 231 McConnell, E. L., Basit, A. W. & Murdan, S., *Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments*. *J Pharm Pharmacol*, 60, 63-70 (2008).
- 232 Zhang, Y. & Klaassen, C. D., *Effects of feeding bile acids and a bile acid sequestrant on hepatic bile acid composition in mice*. *J Lip Res*, 51, 3230-42 (2010).
- 233 Nie, Y.-F., Hun, J. & Yan, X., *Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health*. *Biomed & Biotechnol*, 16, 436-46 (2015).
- 234 Eyssen, H. J., Pauw, G. D. & Eldere, J. v., *Formation of Hyodeoxycholic Acid from Muricholic Acid and Hyocholic Acid by an Unidentified Gram-Positive Rod Termed HDCA-1 Isolated from Rat Intestinal Microflora*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3158-63 (1999).
- 235 ABSCIEX. *Hardware Manual: API 4000™ LC/MS/MS System*. (2010).
- 236 Funk, W., Dammann, V. & Donnevert, G., *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie* -, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, (1992).
- 237 Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I., *Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1157-70 (1998).
- 238 Köhler, W., Schachtel, G. & Voleske, P., *Biostatistik - Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler*, 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2007).
- 239 Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W. & Weiber, R., *Multivariate Analysemethoden* -, 14. Auflage, Springer Verlag, Berlin, (2015).
- 240 Kessler, W., *Multivariate Datenanalyse - Für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*, Wiley-VCH Verlag Weinheim, (2006).
- 241 Hervé, A. & Williams, L. J., *Principal Component Analysis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2, 1-47 (2010).

Teil I – Anhang**1 Analytik von Gallensäuren – Methodenparameter**

TABELLE I-1 Abkürzungsverzeichnis der verwendeten Gallensäuren.

IUPAC	Deutsche Bezeichnung	Englische Bezeichnung
CA	3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Cholic Acid
CDCA	3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Chenodeoxycholic Acid
α -MCA	3 α ,6 β ,7 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure	α -Muricholic Acid
β -MCA	3 α ,6 β ,7 β -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure	β -Muricholic Acid
ω -MCA	3 α ,6 α ,7 β -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure	ω -Muricholic Acid
HCA	3 α ,6 α ,7 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Hyochoolic Acid
UDCA	3 α ,7 β -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Ursodeoxycholic Acid
HDCA	3 α ,6 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Hyoedeoxycholic Acid
DCA	3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Deoxycholic Acid
Iso-DCA	7 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Iso-Deoxycholic Acid
LCA	3 α -Hydroxy-5 β -cholan-24-säure	Lithocholic Acid
Iso-LCA	3 β -Hydroxy-5 β -cholan-24-säure	Iso-Lithocholic Acid
3-KDCA	7 α ,12 α -Dihydroxy-3-on-5 β -cholan-24-säure	3-Ketodeoxycholic Acid
7-KDCA	3 α ,12 α -Dihydroxy-7-on-5 β -cholan-24-säure	7-Ketodeoxycholic Acid
12-KDCA	3 α ,7 α -Dihydroxy-12-on-5 β -cholan-24-säure	12-Ketodeoxycholic Acid
7-KLCA	3 α -Hydroxy-7-on-5 β -cholan-24-säure	7-Ketolithocholic Acid
12-KLCA	3 α -Hydroxy-12-on-5 β -cholan-24-säure	12-Ketolithocholic Acid
6,7-DKLLCA	3 α -Hydroxy-6,7-Dion-5 β -cholan-24-säure	6,7-Diketolithocholic Acid
7,12-DKLLCA	3 α -Hydroxy-7,12-Dion-5 β -cholan-24-säure	7,12-Diketolithocholic Acid
DHCA	3,7,12-Trion-5 β -cholan-24-säure	Dehydrocholic Acid
DHLCA	3-on-5 β -cholan-24-säure	Dehydrolithocholic Acid
TCA	3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure N-(2-sulfoethyl)amid	Taurocholic Acid
TCDCa	3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure N-(2-sulfoethyl)amid	Taurochenodeoxycholic Acid
T- α -MCA	3 α ,6 β ,7 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure N-(2-sulfoethyl)amid	Tauro- α -Muricholic Acid

Fortsetzung TABELLE I-1

	IUPAC	Deutsche Bezeichnung	Englische Bezeichnung
T- β -MCA	3 α ,6 β ,7 β -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Tauro- β -Muricholsäure	<i>Tauro-β-Muricholic Acid</i>
TUDCA	3 α ,7 β -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Tauroursodeoxycholsäure	<i>Tauroursodeoxycholic Acid</i>
THDCA	3 α ,6 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Taurorhyodeoxycholsäure	<i>Taurorhyodeoxycholic Acid</i>
TDCA	3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Taurodeoxycholsäure	<i>Taurodeoxycholic Acid</i>
TLCA	3 α -Hydroxy-5 β -cholan-24-säure	Taurolithocholsäure	<i>Taurolithocholic Acid</i>
GCA	3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Glycocholsäure	<i>Glycocholic Acid</i>
GCDCA	3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Glycochenodeoxycholsäure	<i>Glycochenodeoxycholic Acid</i>
GDCA	3 α ,7 β -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Glycoursodeoxycholsäure	<i>Glycoursodeoxycholic Acid</i>
GLCA	3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure	Glycodeoxycholsäure	<i>Glycodeoxycholic Acid</i>
	3 α -Hydroxy-5 β -cholan-24-säure	Glycolithocholsäure	<i>Glycolithocholic Acid</i>

TABELLE I-2 Optimierte Parameter des massenspektrometrischen Systems für die jeweilige Gallensäure und deren Integration in die entsprechende Periode der MRM-Multimethode.

	Analyt/ Bezeichnung	Rt [min]	MRM-Übergang [m/z]	DT [msec]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
Periode I	T- α -MCA_pos_AA_Qnt	7.71	533.366 → 480.3	150	26	5	23	26
	T- α -MCA_pos_AA_Qal1		533.366 → 126.0	10	26	5	41	20
	T- α -MCA_pos_AA_Qal2		533.366 → 462.4	10	26	5	31	12
	T- β -MCA_positiv_AA_Qnt	8.31	533.253 → 480.3	150	76	10	25	14
	T- β -MCA_positiv_AA_Qal1		533.253 → 516.2	10	76	10	15	16
	T- β -MCA_positiv_AA_Qal2		533.253 → 498.2	10	76	10	19	14
	TUDCA_positiv_AA_Qnt	14.05	517.322 → 464.2	150	76	10	25	14
	TUDCA_positiv_AA_Qal1		517.322 → 500.2	10	76	10	13	16
	TUDCA_positiv_AA_Qal2		517.322 → 482.2	10	76	10	17	14
	THDCA_positiv_AA_Qnt	14.56	517.320 → 500.2	150	71	10	13	14
	THDCA_positiv_AA_Qal1		517.320 → 464.2	10	71	10	23	14
	THDCA_positiv_AA_Qal2		517.320 → 482.3	10	71	10	19	14
	TCA_positiv_AA_Qnt	14.68	533.332 → 516.2	150	76	10	17	16
	TCA_positiv_AA_Qal1		533.332 → 462.2	10	76	10	31	14
	TCA_positiv_AA_Qal2		533.332 → 498.2	10	76	10	21	14
	6,7-DKLCa_pos_AA_Qnt	15.64	422.334 → 405.4	150	11	4	15	12
	6,7-DKLCa_pos_AA_Qal1		422.334 → 351.3	10	11	4	27	10
	6,7-DKLCa_pos_AA-Qal2		422.334 → 369.2	10	11	4	23	20
	7-DHCA_pos_AA_Qnt	15.68	424.374 → 353.3	150	46	4	21	20
	7-DHCA_pos_AA_Qal1		424.374 → 389.4	10	46	4	19	10
	7-DHCA_pos_AA_Qal2		424.374 → 371.3	10	46	4	23	20
	DHCA_pos_AA_Qnt	15.76	420.338 → 385.2	150	46	12	21	20
	DHCA_pos_AA_Qal1		420.338 → 403.4	10	46	12	17	12
	DHCA_pos_AA_Qal2		420.338 → 367.2	10	46	12	29	20
	GUdCA_positiv_AA_Qnt	15.78	467.404 → 450.2	150	36	10	11	14
	GUdCA_positiv_AA_Qal1		467.404 → 414.2	10	36	10	23	12
	GUdCA_positiv_AA_Qal2		467.404 → 432.2	10	36	10	17	12
	GCA_positiv_AA_Qnt	16.18	483.363 → 466.2	150	41	10	15	14
	GCA_positiv_AA_Qal1		483.363 → 412.3	10	41	10	29	12
	GCA_positiv_AA_Qal2		483.363 → 430.2	10	41	10	25	12
	ω -MCA_positiv_AA_Qnt	17.21	426.301 → 373.2	150	41	10	17	10
	ω -MCA_positiv_AA_Qal1		426.301 → 355.2	10	41	10	23	10
	ω -MCA_positiv_AA_Qal2		426.301 → 391.2	10	41	10	13	12
TCdCA_positiv_AA_Qnt	17.51	517.329 → 464.3	150	71	10	27	14	
TCdCA_positiv_AA_Qal1		517.329 → 500.3	10	71	10	13	16	
TCdCA_positiv_AA_Qal2		517.329 → 482.2	10	71	10	19	14	
α -MCA_positiv_AA_Qnt	17.51	426.309 → 373.3	150	41	10	17	10	
α -MCA_positiv_AA_Qal1		426.309 → 355.3	10	41	10	25	10	
α -MCA_positiv_AA_Qal2		426.309 → 391.3	10	41	10	13	12	
12-DHCA_pos_AA_Qnt	17.71	426.367 → 371.3	150	21	8	17	12	
12-DHCA_pos_AA_Qal1		426.367 → 353.3	10	21	8	27	18	
12-DHCA_pos_AA_Qal2		426.367 → 91.1	10	21	8	23	20	

AA: Ammoniumaddukt [M+NH₄]⁺, BP: Basispeak [M+H]⁺; RT: Retentionszeit, DT: Dwell-Time, DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CE: Collision Energy, CXP: Collision Cell Exit Potential

Fortsetzung TABELLE I-2

	Analyt/ Bezeichnung	Rt [min]	MRM-Übergang [m/z]	DT [msec]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
Periode I	TDCA_positiv_AA_Qnt	18.02	517.346 → 500.2	150	71	10	15	16
	TDCA_positiv_AA_Qal1		517.346 → 464.3	10	71	10	29	14
	TDCA_positiv_AA_Qal2		517.346 → 482.2	10	71	10	23	14
	β-MCA_positiv_AA_Qnt	18.02	426.290 → 391.2	150	56	10	15	12
	β-MCA_positiv_AA_Qal1		426.290 → 373.2	10	56	10	19	10
	β-MCA_positiv_AA_Qal2		426.290 → 355.2	10	56	10	25	10
	GCDCA_positiv_AA_Qnt	19.03	467.406 → 450.2	150	36	10	13	12
	GCDCA_positiv_AA_Qal1		467.406 → 414.2	10	36	10	25	12
	GCDCA_positiv_AA_Qal2		467.406 → 432.2	10	36	10	21	14
	d4-GCDCA_pos_AA_Qnt	19.04	471.394 → 454.3	150	36	10	13	14
	d4-GCDCA_pos_AA_Qal1		471.394 → 436.3	10	36	10	19	12
	d4-GCDCA_pos_AA_Qal2		471.394 → 418.3	10	36	10	27	12
	HCA_positiv_AA_Qnt	19.14	409.240 → 373.3	150	36	10	13	8
	HCA_positiv_AA_Qal1		409.240 → 355.3	10	36	10	25	18
	HCA_positiv_AA_Qal2		409.240 → 391.2	10	36	10	11	10
	GDCA_positiv_AA_Qnt	19.64	467.388 → 450.3	150	41	10	13	14
	GDCA_positiv_AA_Qal1		467.388 → 414.3	10	41	10	27	12
	GDCA_positiv_AA_Qal2		467.388 → 432.3	10	41	10	19	12
	3-DHCA_pos_AA_Qnt	19.64	424.366 → 371.3	150	36	4,5	25	20
	3-DHCA_pos_AA_Qal1		424.366 → 353.3	10	36	4,5	27	10
	3-DHCA_pos_AA_Qal2		424.366 → 91.1	10	36	4,5	103	12
	UDCA_positiv_AA_Qnt	20.05	410.179 → 357.2	150	21	10	19	10
	UDCA_positiv_AA_Qal1		410.179 → 81.0	10	21	10	65	12
	UDCA_positiv_AA_Qal2		410.179 → 91.1	10	21	10	99	14
	d4-CA_AA_Qnt	20.15	430.062 → 377.2	150	1	10	19	10
	d4-CA_AA_Qal1		430.062 → 359.2	10	1	10	29	10
	d4-CA_AA_Qal2		430.062 → 358.7	10	1	10	23	10
	CA_positiv_AA_Qnt	20.16	426.337 → 373.2	150	51	10	19	10
	CA_positiv_AA_Qal1		426.337 → 355.2	10	51	10	27	10
	CA_positiv_AA_Qal2		426.337 → 91.0	10	51	10	99	14
HDCA_positiv_AA_Qnt	20.46	410.179 → 357.2	150	76	10	15	10	
HDCA_positiv_AA_Qal1		410.179 → 81.0	10	76	10	9	12	
HDCA_positiv_AA_Qal2		410.179 → 91.1	10	76	10	9	12	
TLCA_positiv_AA_Qnt	20.56	501.345 → 466.2	150	76	10	23	14	
TLCA_positiv_AA_Qal1		501.345 → 484.2	10	76	10	13	14	
TLCA_positiv_AA_Qal2		501.345 → 126.0	10	76	10	49	8	
7-KLCA_pos_AA_Qnt	21.28	408.347 → 391.3	150	31	3,5	17	20	
7-KLCA_pos_AA_Qal1		408.347 → 373.3	10	31	3,5	21	20	
7-KLCA_pos_AA_Qal2		408.347 → 355.3	10	31	3,5	27	18	
12-KLCA_pos_AA_Qnt	21.58	408.369 → 391.4	150	16	4	17	20	
12-KLCA_pos_AA_Qal1		408.369 → 373.4	10	16	4	21	10	
12-KLCA_pos_AA_Qal2		408.369 → 149.1	10	16	4	37	8	
7,12-DKLCA_pos_AA_Qnt	21.58	422.340 → 405.3	150	26	4,5	17	12	
7,12-DKLCA_pos_AA_Qal1		422.340 → 387.3	50	26	4,5	21	20	
7,12-DKLCA_pos_AA_Qal2		422.340 → 351.3	50	26	4,5	27	10	

AA: Ammoniumaddukt $[M+NH_4]^+$, BP: Basispeak $[M+H]^+$; RT: Retentionszeit, DT: Dwell-Time, DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CE: Collision Energy, CXP: Collision Cell Exit Potential

Fortsetzung TABELLE I-2

	Analyt/ Bezeichnung	Rt [min]	MRM-Übergang [m/z]	DT [msec]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
Periode II	GLCA_positiv_AA_Qnt	22.50	451.391 → 434.4	150	36	10	13	14
	GLCA_positiv_AA_Qal1		451.391 → 416.3	50	36	10	21	12
	GLCA_positiv_AA_Qal2		451.391 → 76.0	50	36	10	51	12
	CDCA_pos_AA_Qnt	23.49	410.351 → 357.4	150	36	2.5	23	18
	CDCA_pos_AA_Qal1		410.351 → 59.0	50	36	2.5	51	8
	CDCA_pos_AA_Qal2		410.351 → 101.0	50	36	2.5	31	10
	DCA_pos_AA_Qnt	23.89	410.374 → 357.3	150	31	4.5	21	18
	DCA_pos_AA_Qal1		410.374 → 81.1	50	31	4.5	65	12
	DCA_pos_AA_Qal2		410.374 → 67.0	50	31	4.5	89	8
	Iso-DCA_pos_AA_Qnt	25.72	410.318 → 357.4	150	31	3	21	18
	Iso-DCA_pos_AA_Qal1		410.318 → 67.1	50	31	3	89	8
	Iso-DCA_pos_AA_Qal2		410.318 → 119.2	50	31	3	59	4
	DHLCA_pos_AA_Qnt	27.05	392.395 → 357.3	150	46	4	25	18
	DHLCA_pos_AA_Qal1		392.395 → 375.4	50	46	4	17	10
	DHLCA_pos_AA_Qal2		392.395 → 135.2	50	46	4	39	6
	Analyt/ Bezeichnung	Rt [min]	SIM [m/z]	DP [V]	EP [V]	CXP [V]		
	LCA_Qnt	14.70	375.34	-125	-10	-13		
	Iso-LCA_Qnt	15.06	375.34	-125	-10	-13		

AA: Ammoniumaddukt [M+NH₄]⁺, BP: Basispeak [M+H]⁺; RT: Retentionszeit, DT: Dwell-Time, DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CE: Collision Energy, CXP: Collision Cell Exit Potential

TABELLE I-3 Geräteparameter und Einstellungen des Massenspektrometers.

	Spezifikation
Massenspektrometer	API 4000 QTRAP [®] System (SCIEX, Darmstadt, DE)
Curtain Gas [psi]	10
Collision Gas [psi]	medium
Ionspray Voltage [V]	4500
Temperatur [°C]	550
Ion Source Gas 1 [psi]	40
Ion Source Gas 2 [psi]	50
Interface heater	on
Software	Analyst [®] Software Version: 1.6.1 (SCIEX, Concord, Ontario, CAN)

2 Ergänzungen zum Teil D – Ergebnisse und Diskussion

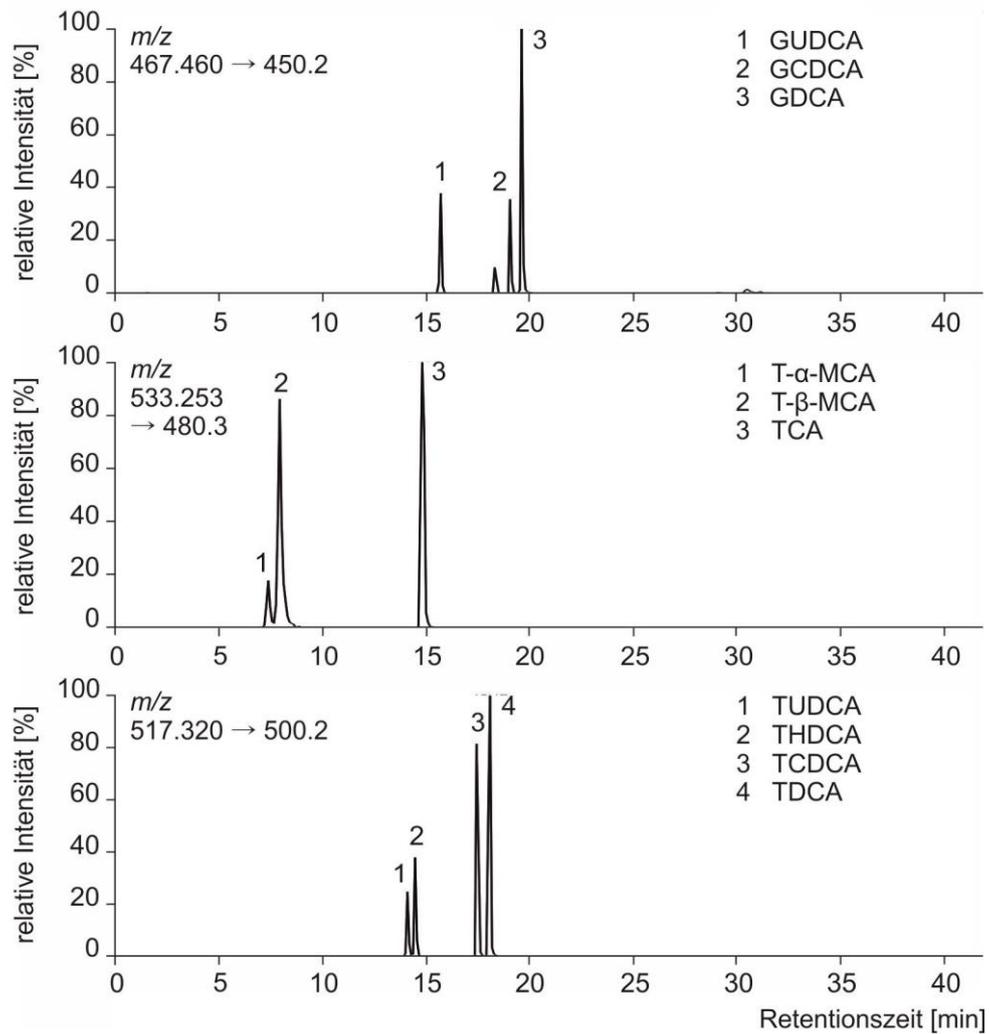


ABBILDUNG I-1 XIC der isobaren Glycin- und Taurinkonjugierten Gallensäuren bei den angegebenen Massenübergängen (Ausschnitt).

TABELLE I-4 Wiederfindungsraten für ausgewählte Gallensäuren nach Extraktion mit Methanol. (MW \pm SD)

	Wiederfindungsrate [%] (n = 3)				
	c [μ M]	Plasma	Fäzes	WAT	Zellkulturnährmedium*
CA	0.19	103.2 \pm 2.4	102.1 \pm 2.7	97.9 \pm 4.1	92.2 \pm 2.3
	1.87	99.4 \pm 3.0	101.9 \pm 3.3	101.0 \pm 2.6	101.2 \pm 4.5
	6.23	101.4 \pm 1.1	99.7 \pm 2.5	104.0 \pm 1.7	102.6 \pm 3.6
3-DHCA	0.18	95.9 \pm 2.7	85.7 \pm 0.6	93.8 \pm 1.1	93.3 \pm 1.2
	2.97	94.0 \pm 3.5	104.5 \pm 1.0	96.2 \pm 2.2	95.3 \pm 1.1
	5.95	107.1 \pm 1.7	93.9 \pm 2.0	95.1 \pm 0.7	95.5 \pm 2.4
6,7-DKLCA	0.36	98.8 \pm 3.2	95.9 \pm 4.3	100.5 \pm 2.4	100.9 \pm 3.4
	3.60	99.1 \pm 1.2	107.1 \pm 4.3	99.6 \pm 3.8	92.7 \pm 3.2
	12.0	96.8 \pm 1.7	103.8 \pm 2.5	96.2 \pm 2.0	95.6 \pm 4.6
GUDCA	0.18	96.3 \pm 3.5	81.5 \pm 0.7	96.3 \pm 2.8	97.5 \pm 2.1
	1.76	103.4 \pm 2.5	97.9 \pm 2.0	99.0 \pm 0.7	103.5 \pm 3.1
	5.87	99.1 \pm 2.1	94.7 \pm 0.9	94.9 \pm 0.4	96.2 \pm 3.4
TDCA	0.18	89.8 \pm 2.2	86.6 \pm 4.7	95.0 \pm 4.6	95.8 \pm 2.1
	1.83	94.4 \pm 4.3	92.0 \pm 4.3	95.3 \pm 0.9	98.4 \pm 4.2
	6.10	86.3 \pm 1.3	97.3 \pm 4.3	96.7 \pm 0.5	95.5 \pm 0.8

* Zellkulturnährmedium: Minimal Medium (MM), siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 2.1.2

TABELLE I-5 Kurvenparameter der linearen Regression für die Grundkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode. Die Abkürzungen der Gallensäuren sind der Tabelle I-1 zu entnehmen.

	LLOQ [μM]	Lineare Regression (n = 5)			
		Steigung m (MW \pm SD)	R ² (MW \pm SD)	S _v [μM] (MW \pm SD)	C _v [%] (MW \pm SD)
CA	0.011	0.769 \pm 0.021	0.997 \pm 0.002	0.051 \pm 0.001	10.44 \pm 0.29
CDCA	0.008	0.561 \pm 0.033	0.996 \pm 0.002	0.014 \pm 0.001	11.09 \pm 0.69
α -MCA	0.045	0.208 \pm 0.012	0.997 \pm 0.003	0.019 \pm 0.002	15.58 \pm 1.77
β -MCA	0.010	0.165 \pm 0.015	0.995 \pm 0.003	0.018 \pm 0.002	13.10 \pm 1.43
ω -MCA	0.012	0.142 \pm 0.027	0.997 \pm 0.005	0.031 \pm 0.003	11.86 \pm 1.15
HCA	0.007	0.352 \pm 0.039	0.996 \pm 0.001	0.062 \pm 0.006	13.49 \pm 1.27
UDCA	0.020	0.063 \pm 0.002	0.998 \pm 0.001	0.020 \pm 0.001	8.65 \pm 0.22
HDCA	0.021	0.081 \pm 0.004	0.995 \pm 0.002	0.054 \pm 0.002	13.46 \pm 0.59
DCA	0.007	1.974 \pm 0.088	0.997 \pm 0.002	0.049 \pm 0.002	10.69 \pm 0.49
Iso-DCA	0.009	2.814 \pm 0.111	0.999 \pm 0.005	0.050 \pm 0.002	10.34 \pm 0.41
3-KDCA	0.013	1.062 \pm 0.060	0.997 \pm 0.001	0.073 \pm 0.004	15.46 \pm 0.94
7-KDCA	0.055	0.048 \pm 0.006	0.995 \pm 0.003	0.062 \pm 0.006	9.69 \pm 1.00
12-KDCA	0.007	0.419 \pm 0.039	0.997 \pm 0.002	0.068 \pm 0.007	14.19 \pm 1.48
7-KLCA	0.007	0.703 \pm 0.032	0.997 \pm 0.002	0.156 \pm 0.007	9.99 \pm 0.45
12-KLCA	0.012	4.715 \pm 0.253	0.997 \pm 0.004	0.051 \pm 0.003	10.40 \pm 0.57
6,7-DKLCA	0.016	5.385 \pm 0.322	0.998 \pm 0.040	0.025 \pm 0.002	10.62 \pm 0.70
7,12-DKLCA	0.153	0.082 \pm 0.355	0.996 \pm 0.002	0.360 \pm 0.006	10.44 \pm 0.17
DHCA	0.021	0.574 \pm 0.019	0.997 \pm 0.004	0.037 \pm 0.001	12.17 \pm 0.39
DHLCA	0.035	0.073 \pm 0.007	0.995 \pm 0.005	0.125 \pm 0.011	7.24 \pm 0.62
TCA	0.050	0.277 \pm 0.011	0.998 \pm 0.002	0.235 \pm 0.010	11.80 \pm 0.48
TCDCA	0.021	0.700 \pm 0.029	0.997 \pm 0.003	0.014 \pm 0.001	11.31 \pm 0.46
T- α -MCA	0.019	0.982 \pm 0.062	0.995 \pm 0.003	0.032 \pm 0.002	12.11 \pm 0.82
T- β -MCA	0.079	0.107 \pm 0.004	0.993 \pm 0.003	0.172 \pm 0.006	14.44 \pm 0.48
TUDCA	0.005	0.258 \pm 0.005	0.997 \pm 0.001	0.012 \pm 0.001	10.45 \pm 0.20
THDCA	0.005	0.811 \pm 0.017	0.997 \pm 0.001	0.010 \pm 0.001	8.71 \pm 0.18
TDCA	0.007	0.768 \pm 0.023	0.997 \pm 0.001	0.012 \pm 0.001	9.97 \pm 0.30
TLCA	0.005	0.552 \pm 0.013	0.998 \pm 0.002	0.007 \pm 0.001	10.60 \pm 0.25
GCA	0.015	2.136 \pm 0.087	0.996 \pm 0.003	0.016 \pm 0.001	12.03 \pm 0.50
GCDCA	0.020	3.427 \pm 0.121	0.997 \pm 0.002	0.014 \pm 0.001	10.03 \pm 0.36
GUDCA	0.021	0.764 \pm 0.018	0.999 \pm 0.001	0.009 \pm 0.001	7.15 \pm 0.17
GDCA	0.028	1.902 \pm 0.101	0.997 \pm 0.002	0.046 \pm 0.002	14.66 \pm 0.74
GLCA	0.011	1.333 \pm 0.196	0.997 \pm 0.001	0.150 \pm 0.019	9.42 \pm 1.21
LCA	0.015	2.277 \pm 0.023	0.999 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	4.85 \pm 0.05
Iso-LCA	0.099	0.552 \pm 0.008	0.999 \pm 0.001	0.016 \pm 0.000	6.35 \pm 0.09

LLOQ: *Lower Limit of Quantitation* bzw. Bestimmungsgrenze, R²: Regressionskoeffizient, S_v: Verfahrensvariationskoeffizient, C_v: Verfahrensvariationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

TABELLE I-6 Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Plasma.
Die Abkürzungen der Gallensäuren sind der Tabelle I-1 zu entnehmen.

	Lineare Regression (n = 3)				
	LLoQ [μM]	Steigung m (MW \pm SD)	R ² (MW \pm SD)	S _v [μM] (MW \pm SD)	C _v [%] (MW \pm SD)
CA	0.036	0.420 \pm 0.022	0.999 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001	5.92 \pm 0.43
CDCA	0.054	0.256 \pm 0.016	0.998 \pm 0.001	0.027 \pm 0.002	10.81 \pm 0.69
α -MCA	0.027	0.087 \pm 0.003	0.996 \pm 0.003	0.023 \pm 0.001	9.45 \pm 0.27
β -MCA	0.075	0.074 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.030 \pm 0.001	11.52 \pm 0.01
ω -MCA	0.084	0.072 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.031 \pm 0.002	12.74 \pm 0.72
HCA	0.096	0.123 \pm 0.002	0.999 \pm 0.002	0.017 \pm 0.001	6.99 \pm 0.11
UDCA	0.142	0.029 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.034 \pm 0.007	7.05 \pm 1.49
HDCA	0.129	0.030 \pm 0.003	0.999 \pm 0.001	0.065 \pm 0.006	7.81 \pm 0.67
DCA	0.064	0.978 \pm 0.046	0.997 \pm 0.003	0.035 \pm 0.002	14.56 \pm 0.68
Iso-DCA	0.083	1.235 \pm 0.109	0.998 \pm 0.001	0.025 \pm 0.003	10.11 \pm 1.01
3-KDCA	0.018	0.259 \pm 0.003	0.998 \pm 0.001	0.022 \pm 0.001	9.01 \pm 0.11
7-KDCA	0.085	0.026 \pm 0.003	0.998 \pm 0.001	0.041 \pm 0.005	11.77 \pm 1.48
12-KDCA	0.115	0.116 \pm 0.007	0.998 \pm 0.001	0.035 \pm 0.002	13.91 \pm 0.81
7-KLCA	0.190	0.265 \pm 0.013	0.999 \pm 0.001	0.072 \pm 0.003	8.81 \pm 0.42
12-KLCA	0.038	2.043 \pm 0.325	0.995 \pm 0.004	0.035 \pm 0.007	2.77 \pm 0.56
6,7-DKLCA	0.050	2.168 \pm 0.120	0.997 \pm 0.002	0.052 \pm 0.003	10.57 \pm 0.61
7,12-DKLCA	0.242	0.028 \pm 0.001	0.998 \pm 0.001	0.179 \pm 0.006	9.36 \pm 0.32
DHCA	0.037	0.243 \pm 0.015	0.999 \pm 0.001	0.034 \pm 0.002	13.77 \pm 0.89
DHLCA	0.529	0.035 \pm 0.003	0.997 \pm 0.002	0.087 \pm 0.007	9.06 \pm 0.73
TCA	0.209	0.143 \pm 0.009	0.999 \pm 0.001	0.202 \pm 0.013	13.73 \pm 0.85
TCDCA	0.181	0.220 \pm 0.003	0.997 \pm 0.003	0.027 \pm 0.001	10.79 \pm 0.12
T- α -MCA	0.075	0.295 \pm 0.021	0.999 \pm 0.003	0.017 \pm 0.001	7.02 \pm 0.56
T- β -MCA	0.612	0.046 \pm 0.001	0.997 \pm 0.004	0.271 \pm 0.007	11.03 \pm 0.29
TUDCA	0.081	0.179 \pm 0.016	0.994 \pm 0.005	0.030 \pm 0.003	12.11 \pm 1.20
THDCA	0.091	0.283 \pm 0.010	0.998 \pm 0.002	0.025 \pm 0.001	10.51 \pm 0.37
TDCA	0.016	0.550 \pm 0.021	0.999 \pm 0.001	0.010 \pm 0.000	8.39 \pm 0.32
TLCA	0.029	0.461 \pm 0.059	0.999 \pm 0.001	0.010 \pm 0.001	10.61 \pm 1.57
GCA	0.056	0.753 \pm 0.024	0.998 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.58 \pm 0.34
GCDCA	0.026	1.553 \pm 0.123	0.992 \pm 0.009	0.010 \pm 0.001	14.28 \pm 1.16
GUDCA	0.056	0.863 \pm 0.054	0.999 \pm 0.001	0.018 \pm 0.001	7.67 \pm 0.52
GDCA	0.083	0.929 \pm 0.253	0.992 \pm 0.011	0.033 \pm 0.007	14.13 \pm 2.94
GLCA	-	2.992 \pm 0.136	0.996 \pm 0.002	0.003 \pm 0.000	6.38 \pm 0.02
LCA	0.010	2.064 \pm 0.052	0.999 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000	4.41 \pm 0.10
Iso-LCA	0.013	0.650 \pm 0.015	0.999 \pm 0.000	0.002 \pm 0.000	4.02 \pm 0.09

LLoQ: *Lower Limit of Quantitation* bzw. Bestimmungsgrenze, R²: Regressionskoeffizient, S_v: Verfahrensvariationskoeffizient, C_v: Verfahrensvariationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

TABELLE I-7 Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Fäzes.
Die Abkürzungen der Gallensäuren sind der Tabelle I-1 zu entnehmen.

	Lineare Regression (n = 3)				
	LLoQ [μM]	Steigung m (MW \pm SD)	R ² (MW \pm SD)	S _v [μM] (MW \pm SD)	C _v [%] (MW \pm SD)
CA	0.119	0.346 \pm 0.010	0.999 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.23 \pm 0.32
CDCA	0.037	0.233 \pm 0.013	0.999 \pm 0.001	0.030 \pm 0.002	11.98 \pm 0.67
α -MCA	0.045	0.087 \pm 0.005	0.998 \pm 0.002	0.023 \pm 0.001	9.18 \pm 0.47
β -MCA	0.367	0.056 \pm 0.004	0.998 \pm 0.001	0.038 \pm 0.002	14.73 \pm 0.93
ω -MCA	0.183	0.071 \pm 0.003	0.996 \pm 0.002	0.047 \pm 0.002	11.09 \pm 0.43
HCA	0.128	0.126 \pm 0.018	0.998 \pm 0.001	0.019 \pm 0.002	7.85 \pm 0.94
UDCA	0.131	0.029 \pm 0.003	0.999 \pm 0.007	0.055 \pm 0.005	11.28 \pm 1,09
HDCA	0.387	0.032 \pm 0.002	0.996 \pm 0.003	0.066 \pm 0.004	7.94 \pm 0.48
DCA	0.255	0.745 \pm 0.035	0.999 \pm 0.001	0.035 \pm 0.002	14.71 \pm 0.70
Iso-DCA	0.086	1.095 \pm 0.079	0.999 \pm 0.006	0.018 \pm 0.001	7.33 \pm 0.48
3-KDCA	0.073	0.271 \pm 0.010	0.998 \pm 0.002	0.026 \pm 0.001	10.69 \pm 0.38
7-KDCA	0.276	0.022 \pm 0.001	0.996 \pm 0.001	0.036 \pm 0.000	10.34 \pm 0.13
12-KDCA	0.156	0.120 \pm 0.005	0.996 \pm 0.001	0.036 \pm 0.001	14.46 \pm 0.58
7-KLCA	0.275	0.281 \pm 0.019	0.997 \pm 0.001	0.118 \pm 0.008	14.53 \pm 0.99
12-KLCA	0.065	1.537 \pm 0.010	0.998 \pm 0.001	0.022 \pm 0.001	8.60 \pm 0.51
6,7-DKLCA	0.199	1.996 \pm 0.066	0.998 \pm 0.001	0.049 \pm 0.002	9.95 \pm 0.34
7,12-DKLCA	0.529	0.028 \pm 0.002	0.999 \pm 0.013	0.023 \pm 0.013	12.04 \pm 0.66
DHCA	0.039	0.230 \pm 0.008	0.999 \pm 0.000	0.021 \pm 0.001	8.31 \pm 0.28
DHLCA	0.605	0.037 \pm 0.001	0.996 \pm 0.003	0.113 \pm 0.004	11.74 \pm 0.40
TCA	0.145	0.093 \pm 0.008	0.998 \pm 0.001	0.358 \pm 0.030	8.72 \pm 0.74
TCDCA	0.058	0.291 \pm 0.027	0.997 \pm 0.002	0.019 \pm 0.002	7.42 \pm 0.74
T- α -MCA	0.090	0.302 \pm 0.014	0.999 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.78 \pm 0.49
T- β -MCA	1.688	0.043 \pm 0.006	0.993 \pm 0.005	0.332 \pm 0.037	13.51 \pm 1.50
TUDCA	0.099	0.142 \pm 0.008	0.998 \pm 0.001	0.032 \pm 0.002	13.33 \pm 0.71
THDCA	0.051	0.377 \pm 0.021	0.996 \pm 0.004	0.011 \pm 0.001	4.54 \pm 0.23
TDCA	0.040	0.658 \pm 0.018	0.999 \pm 0.001	0.010 \pm 0.001	8.01 \pm 0.22
TLCA	0.039	0.513 \pm 0.029	0.997 \pm 0.003	0.011 \pm 0.001	12.23 \pm 0.71
GCA	0.046	0.846 \pm 0.067	0.998 \pm 0.001	0.019 \pm 0.001	7.71 \pm 0.57
GCDCA	0.054	1.592 \pm 0.112	0.998 \pm 0.001	0.025 \pm 0.002	14.06 \pm 1.04
GUDCA	0.102	0.959 \pm 0.026	0.997 \pm 0.002	0.024 \pm 0.001	9.88 \pm 0.27
GDCA	0.096	0.795 \pm 0.019	0.997 \pm 0.003	0.024 \pm 0.001	10.14 \pm 0.24
GLCA	0.127	2.539 \pm 0.020	0.996 \pm 0.002	0.011 \pm 0.002	4.46 \pm 0.69
LCA	0.132	2.096 \pm 0.086	0.997 \pm 0.001	0.003 \pm 0.000	8.17 \pm 0.34
Iso-LCA	0.213	0.635 \pm 0.036	0.997 \pm 0.002	0.004 \pm 0.000	9.03 \pm 0.53

LLoQ: *Lower Limit of Quantitation* bzw. Bestimmungsgrenze, R²: Regressionskoeffizient, S_v: Verfahrensvariationskoeffizient, C_v: Verfahrensvariationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

**TABELLE I-8 Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Fettge-
webe.** Die Abkürzungen der Gallensäuren sind der Tabelle I-1 zu entnehmen.

	Lineare Regression (n = 3)				
	LLoQ [μM]	Steigung m (MW \pm SD)	R ² (MW \pm SD)	S _v [μM] (MW \pm SD)	C _v [%] (MW \pm SD)
CA	0.034	0.350 \pm 0.014	0.999 \pm 0.002	0.033 \pm 0.001	13.01 \pm 0.54
CDCA	0.049	0.243 \pm 0.007	0.999 \pm 0.001	0.025 \pm 0.001	9.69 \pm 0.27
α -MCA	0.083	0.084 \pm 0.001	0.999 \pm 0.001	0.017 \pm 0.001	6.83 \pm 0.08
β -MCA	0.113	0.073 \pm 0.010	0.999 \pm 0.005	0.035 \pm 0.006	13.61 \pm 2.35
ω -MCA	0.125	0.072 \pm 0.003	0.997 \pm 0.002	0.029 \pm 0.001	11.83 \pm 0.45
HCA	0.059	0.140 \pm 0.021	0.998 \pm 0.001	0.026 \pm 0.003	10.67 \pm 1.38
UDCA	0.177	0.028 \pm 0.002	0.996 \pm 0.003	0.037 \pm 0.002	7.54 \pm 0.46
HDCA	0.146	0.037 \pm 0.007	0.996 \pm 0.003	0.057 \pm 0.011	6.82 \pm 1.27
DCA	0.061	0.806 \pm 0.037	0.999 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001	11.35 \pm 0.52
Iso-DCA	0.026	1.123 \pm 0.077	0.994 \pm 0.007	0.022 \pm 0.001	9.00 \pm 0.57
3-KDCA	0.073	0.298 \pm 0.022	0.990 \pm 0.014	0.020 \pm 0.002	8.15 \pm 0.68
7-KDCA	0.050	0.023 \pm 0.001	0.999 \pm 0.001	0.020 \pm 0.001	7.02 \pm 0.16
12-KDCA	0.074	0.139 \pm 0.005	0.999 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.53 \pm 0.39
7-KLCA	0.201	0.350 \pm 0.018	0.998 \pm 0.002	0.086 \pm 0.004	10.61 \pm 0.55
12-KLCA	0.092	2.085 \pm 0.023	0.998 \pm 0.001	0.020 \pm 0.000	7.90 \pm 0.09
6,7-DKLCA	0.086	2.084 \pm 0.066	0.998 \pm 0.001	0.050 \pm 0.002	10.10 \pm 0.32
7,12-DKLCA	0.873	0.032 \pm 0.002	0.998 \pm 0.001	0.252 \pm 0.015	13.15 \pm 0.76
DHCA	0.018	0.242 \pm 0.001	0.999 \pm 0.000	0.006 \pm 0.000	2.36 \pm 0.01
DHLCA	0.330	0.039 \pm 0.001	0.998 \pm 0.002	0.097 \pm 0.003	10.06 \pm 0.31
TCA	1.349	0.096 \pm 0.007	0.996 \pm 0.003	0.160 \pm 0.010	10.88 \pm 0.71
TCDCA	0.192	0.214 \pm 0.006	0.999 \pm 0.001	0.031 \pm 0.001	12.59 \pm 0.37
T- α -MCA	0.160	0.248 \pm 0.003	0.999 \pm 0.018	0.019 \pm 0.001	7.84 \pm 0.10
T- β -MCA	1.177	0.044 \pm 0.002	0.998 \pm 0.002	0.192 \pm 0.007	7.80 \pm 0.30
TUDCA	0.102	0.141 \pm 0.002	0.998 \pm 0.001	0.019 \pm 0.001	7.74 \pm 0.05
THDCA	0.041	0.307 \pm 0.001	0.999 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001	6.04 \pm 0.23
TDCA	0.064	0.597 \pm 0.024	0.998 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001	11.48 \pm 0.47
TLCA	0.009	0.912 \pm 0.048	0.998 \pm 0.003	0.002 \pm 0.000	7.04 \pm 0.31
GCA	0.195	0.919 \pm 0.003	0.997 \pm 0.000	0.035 \pm 0.004	13.95 \pm 1.78
GCDCA	0.101	1.539 \pm 0.037	0.997 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001	8.23 \pm 0.80
GUDCA	0.111	0.940 \pm 0.046	0.998 \pm 0.002	0.029 \pm 0.002	12.15 \pm 0.61
GDCA	0.214	0.809 \pm 0.025	0.994 \pm 0.004	0.030 \pm 0.001	12.78 \pm 0.38
GLCA	0.213	1.531 \pm 0.017	0.995 \pm 0.003	0.003 \pm 0.000	4.89 \pm 0.43
LCA	0.155	1.846 \pm 0.023	0.998 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000	5.75 \pm 0.09
Iso-LCA	0.244	0.603 \pm 0.018	0.998 \pm 0.001	0.003 \pm 0.000	6.13 \pm 0.19

LLoQ: *Lower Limit of Quantitation* bzw. Bestimmungsgrenze, R²: Regressionskoeffizient, S_v: Verfahrensvariationskoeffizient, C_v: Verfahrensvariationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

TABELLE I-9 Kurvenparameter der Matrixkalibrierung der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Zellkulturnährmedium (MM). Die Abkürzungen der Gallensäuren sind der Tabelle I-1 zu entnehmen.

	LLOQ [μM]	Lineare Regression (n = 3)			
		Steigung m (MW \pm SD)	R ² (MW \pm SD)	S _v [μM] (MW \pm SD)	C _v [%] (MW \pm SD)
CA	0.092	0.365 \pm 0.002	0.999 \pm 0.001	0.018 \pm 0.001	6.87 \pm 0.13
CDCA	0.085	0.172 \pm 0.003	0.998 \pm 0.001	0.022 \pm 0.001	8.82 \pm 0.20
α -MCA	0.035	0.068 \pm 0.001	0.998 \pm 0.001	0.024 \pm 0.001	9.56 \pm 0.22
β -MCA	0.211	0.033 \pm 0.001	0.999 \pm 0.001	0.019 \pm 0.013	6.43 \pm 0.44
ω -MCA	0.130	0.063 \pm 0.001	0.997 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	10.80 \pm 0.22
HCA	0.054	0.010 \pm 0.002	0.999 \pm 0.001	0.016 \pm 0.001	5.83 \pm 0.20
UDCA	0.735	0.015 \pm 0.001	0.999 \pm 0.001	0.022 \pm 0.001	4.56 \pm 0.21
HDCA	0.296	0.029 \pm 0.001	0.999 \pm 0.001	0.055 \pm 0.004	6.64 \pm 0.50
DCA	0.032	4.044 \pm 0.228	0.998 \pm 0.001	0.008 \pm 0.000	8.79 \pm 0.28
Iso-DCA	0.142	0.839 \pm 0.027	0.998 \pm 0.001	0.023 \pm 0.002	9.21 \pm 0.68
3-KDCA	0.039	0.228 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001	5.91 \pm 0.53
7-KDCA	0.072	0.002 \pm 0.000	0.998 \pm 0.001	0.023 \pm 0.001	6.79 \pm 0.37
12-KDCA	0.064	0.124 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.019 \pm 0.001	7.52 \pm 0.13
7-KLCA	0.216	0.187 \pm 0.001	0.999 \pm 0.001	0.039 \pm 0.003	4.84 \pm 0.40
12-KLCA	0.061	1.719 \pm 0.047	0.999 \pm 0.001	0.018 \pm 0.002	7.25 \pm 0.77
6,7-DKLCA	0.173	1.567 \pm 0.022	0.997 \pm 0.001	0.052 \pm 0.002	10.45 \pm 0.34
7,12-DKLCA	0.431	0.033 \pm 0.001	0.998 \pm 0.001	0.131 \pm 0.006	7.94 \pm 0.37
DHCA	0.038	0.183 \pm 0.008	0.999 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001	5.28 \pm 0.15
DHLCA	0.201	0.027 \pm 0.001	0.998 \pm 0.001	0.079 \pm 0.003	9.06 \pm 1.16
TCA	1.642	0.132 \pm 0.007	0.998 \pm 0.001	0.378 \pm 0.005	9.21 \pm 0.13
TCDCA	0.022	0.213 \pm 0.008	0.999 \pm 0.000	0.010 \pm 0.001	3.88 \pm 0.09
T- α -MCA	0.083	0.303 \pm 0.003	0.999 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001	6.47 \pm 0.22
T- β -MCA	0.156	0.044 \pm 0.001	0.999 \pm 0.000	0.112 \pm 0.003	8.72 \pm 0.22
TUDCA	0.040	0.128 \pm 0.018	0.999 \pm 0.001	0.011 \pm 0.001	4.41 \pm 0.31
THDCA	0.043	0.306 \pm 0.019	0.999 \pm 0.000	0.009 \pm 0.000	3.92 \pm 0.11
TDCA	0.030	0.578 \pm 0.036	0.999 \pm 0.000	0.008 \pm 0.000	6.31 \pm 0.08
TLCA	0.022	0.201 \pm 0.004	0.999 \pm 0.001	0.006 \pm 0.000	6.53 \pm 0.13
GCA	0.042	0.931 \pm 0.039	0.999 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001	5.45 \pm 0.22
GCDCA	0.035	1.179 \pm 0.026	0.999 \pm 0.001	0.007 \pm 0.000	3.69 \pm 0.60
GUDCA	0.082	0.924 \pm 0.029	0.999 \pm 0.001	0.015 \pm 0.002	6.24 \pm 0.87
GDCA	0.077	0.706 \pm 0.014	0.999 \pm 0.001	0.017 \pm 0.001	7.17 \pm 0.53
GLCA	0.102	0.590 \pm 0.011	0.997 \pm 0.001	0.003 \pm 0.000	4.48 \pm 0.15
LCA	0.154	1.597 \pm 0.033	0.999 \pm 0.001	0.016 \pm 0.001	5.92 \pm 0.32
Iso-LCA	0.178	0.529 \pm 0.023	0.999 \pm 0.001	0.008 \pm 0.002	2.98 \pm 0.59

LLOQ: *Lower Limit of Quantitation* bzw. Bestimmungsgrenze, R²: Regressionskoeffizient, S_v: Verfahrensvariationskoeffizient, C_v: Verfahrensvariationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.2.3)

TABELLE I-10 Präzision und Genauigkeit unter Wiederholungs- (WD) und Vergleichsbedingungen (VGL) beispielhaft für die Matrix Plasma. Die Abkürzungen der Gallensäuren sind der Tabelle I-1 zu entnehmen.

	QC-Konzentration [µM]	Präzision		Genauigkeit		
		WD (n = 5) [%]	VGL (n = 9) [%]	WD (n = 5) RE [%]	VGL (n = 9) RE [%]	
CA	QC1	0.19	1.81	8.42	5.25	-5.30
	QC2	1.87	2.07	10.00	-0.62	-1.66
	QC3	6.23	2.11	8.29	1.95	0.63
CDCA	QC1	0.18	4.93	7.50	-6.35	-6.34
	QC2	1.85	5.76	5.90	-0.15	-2.62
	QC3	6.16	5.55	4.15	-2.48	-3.66
α-MCA	QC1	0.18	5.84	12.71	-4.77	-4.34
	QC2	1.81	3.36	12.06	2.74	2.73
	QC3	6.03	11.07	12.55	1.00	-3.41
β-MCA	QC1	0.19	2.53	9.38	-5.97	2.11
	QC2	1.87	5.52	9.39	4.97	-2.29
	QC3	6.24	8.70	8.61	1.93	-2.20
ω-MCA	QC1	0.18	8.69	10.73	-5.67	-0.01
	QC2	1.76	10.35	7.05	-0.18	-3.25
	QC3	5.87	3.76	7.46	7.04	-2.24
HCA	QC1	0.17	6.36	8.90	4.16	-4.48
	QC2	1.75	5.74	4.47	1.73	2.39
	QC3	5.82	3.39	4.41	1.05	1.19
UDCA	QC1	0.35	2.95	7.71	2.76	-3.12
	QC2	3.53	2.22	8.54	2.32	-3.17
	QC3	11.77	5.31	9.18	2.23	0.26
HDCA	QC1	0.20	1.77	5.77	-1.93	1.24
	QC2	6.08	5.23	4.11	1.12	1.93
	QC3	20.27	3.82	6.42	2.72	-0.60
DCA	QC1	0.18	1.66	2.11	3.90	-3.93
	QC2	1.75	5.51	7.07	-0.80	-3.34
	QC3	5.83	1.78	6.42	-3.87	-2.85
Iso-DCA	QC1	0.18	4.76	10.67	4.27	2.23
	QC2	1.82	2.42	9.29	2.46	0.45
	QC3	6.06	5.49	6.48	5.91	-2.42
3-KDCA	QC1	0.30	5.37	5.42	-2.52	-0.52
	QC2	2.97	4.68	9.89	-2.52	5.62
	QC3	5.95	5.75	3.28	-2.21	3.02
7-KDCA	QC1	0.18	5.24	5.10	13.37	-1.56
	QC2	1.81	5.44	9.03	1.04	-3.04
	QC3	6.03	4.87	9.25	-3.55	1.42
12-KDCA	QC1	0.18	8.65	2.69	9.68	-3.26
	QC2	1.82	5.74	8.64	-3.25	2.48
	QC3	6.06	4.47	6.08	2.10	0.74
7-KLCA	QC1	0.59	4.12	3.66	4.55	5.37
	QC2	5.92	1.56	11.02	4.77	-2.27
	QC3	19.72	3.70	6.77	2.44	1.07
12-KLCA	QC1	0.18	1.47	6.01	6.38	-3.68
	QC2	1.84	1.57	3.79	4.58	1.99
	QC3	6.15	7.67	6.46	0.96	-2.04

QC: Quality Control sample, RE: Relative Error (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.4)

Fortsetzung TABELLE I-10

	QC-Konzentration [µM]	Präzision		Genauigkeit		
		WD (n = 5) [%]	VGL (n = 9) [%]	WD (n = 5) RE [%]	VGL (n = 9) RE [%]	
6,7-DKLCA	QC1	0.36	4.90	4.40	2.99	-4.33
	QC2	3.60	3.07	11.06	-0.06	1.37
	QC3	12.01	5.38	3.36	-3.74	-2.23
7,12-DKLCA	QC1	1.20	3.85	5.30	9.70	5.88
	QC2	11.99	4.15	4.66	4.33	2.18
	QC3	39.97	5.54	7.40	-1.16	1.51
DHCA	QC1	0.18	4.14	8.38	8.80	-1.40
	QC2	1.81	1.42	6.00	-3.36	-2.91
	QC3	6.04	4.97	4.05	1.93	-2.60
DHLCA	QC1	0.60	1.15	6.17	-3.40	-4.67
	QC2	6.01	3.70	2.99	-0.09	2.72
	QC3	20.03	7.28	3.91	-4.15	2.08
TCA	QC1	3.01	4.34	10.95	7.23	-1.95
	QC2	30.10	5.04	4.61	-2.96	2.11
	QC3	100.3	1.38	6.89	-2.09	2.60
TCDCA	QC1	0.18	11.13	3.29	-0.72	1.02
	QC2	1.83	8.89	11.72	1.59	1.41
	QC3	6.10	4.69	5.29	2.53	2.25
T-α-MCA	QC1	0.18	3.02	7.46	4.14	2.54
	QC2	1.75	9.56	9.87	4.77	1.42
	QC3	5.84	6.52	8.73	-2.71	1.43
T-β-MCA	QC1	1.80	1.86	7.34	-2.21	-3.64
	QC2	18.02	7.57	4.45	-0.93	2.73
	QC3	60.06	1.11	3.34	-1.78	-0.90
TUDCA	QC1	0.18	2.93	7.40	-2.46	-2.34
	QC2	1.79	3.65	6.90	-0.26	2.01
	QC3	5.95	2.04	9.11	-3.70	-1.03
THDCA	QC1	0.18	3.24	6.23	-1.96	0.22
	QC2	1.77	9.78	5.92	-2.30	0.82
	QC3	5.88	3.99	6.18	0.20	1.07
TDCA	QC1	0.18	3.23	7.28	-0.02	-1.29
	QC2	1.83	6.54	10.93	-2.36	2.95
	QC3	6.10	10.20	6.07	-0.27	-0.48
TLCA	QC1	0.18	2.57	8.42	3.74	-3.34
	QC2	1.79	2.18	5.73	2.59	-0.46
	QC3	5.95	2.94	4.72	0.22	1.98
GCA	QC1	0.18	4.67	6.57	-7.68	-2.39
	QC2	1.82	11.24	4.12	4.59	2.36
	QC3	6.06	9.53	6.48	0.23	1.49
GCDCA	QC1	0.37	5.33	4.43	-5.32	-1.67
	QC2	3.67	3.44	4.54	2.50	-0.23
	QC3	12.23	5.56	6.25	-1.20	0.97
GUDCA	QC1	0.18	3.39	7.01	-1.39	-1.94
	QC2	1.76	3.88	7.25	2.90	0.86
	QC3	5.87	1.67	4.10	-1.17	1.53

QC: Quality Control sample, RE: Relative Error (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.4)

Fortsetzung TABELLE I-10

	QC-Konzentration [µM]	Präzision		Genauigkeit		
		WD (n = 5) [%]	VGL (n = 9) [%]	WD (n = 5) RE [%]	VGL (n = 9) RE [%]	
GDCA	QC1	0.17	6.11	2.27	-1.83	-0.75
	QC2	1.71	3.43	7.98	-1.26	-0.51
	QC3	5.69	4.67	7.69	-0.74	-1.75
GLCA	QC1	0.20	5.16	6.58	-4.84	6.41
	QC2	2.00	11.41	3.63	-4.17	5.18
	QC3	6.02	3.17	7.17	-2.90	3.96
LCA	QC1	0.40	0.75	6.21	6.83	2.92
	QC2	1.21	3.40	4.97	3.71	1.40
	QC3	12.05	1.05	3.69	-7.86	-1.62
Iso-LCA	QC1	0.40	6.79	4.64	7.05	-2.98
	QC2	1.21	3.00	2.77	3.71	0.78
	QC3	11.98	1.60	7.78	-2.40	-2.43

QC: Quality Control sample, RE: Relative Error (siehe Teil G – Material und Methoden Nr. 1.4.4)

3 Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte

3.1 Chemikalien

TABELLE I-11 Chemikalienverzeichnis. Die Abkürzungen der Gallensäuren sind der Tabelle I-1 zu entnehmen.

	CAS-Nr.	Hersteller	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril, LC-MS-Grade	75-05-8	Carl Roth GmbH & Co. KG	07	225, 302+312+ 319, 335	210, 280, 305+ 351+338
Ameisensäure (≥ 99%)	64-18-6	VWR International GmbH	02, 05	226, 290, 314	280, 305+351+ 338, 310
Ammoniak (25%)	1336-21-6	Carl Roth GmbH & Co. KG	05, 07, 09	290, 314, 335, 400	261, 273, 280, 305+351+338
Ammoniumacetat	631-61-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Ammoniumcarbonat	10361-29-2	Carl Roth GmbH & Co. KG	07	302, 315, 318	280, 302+352, 305+351+338, 313
CDCA	474-25-9	Sigma Aldrich Chemie GmbH	08	361, 303	281, 202, 312, 308+313, 405, 501
Chloroform	67-66-3	Carl Roth GmbH & Co. KG	07, 08	302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372	281, 302+352, 304+340, 305+ 351+338, 308+ 310
Cholesterol	57-88-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
CA	81-25-4	Sigma Aldrich Co. LLC.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
DCA	83-44-3	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	302, 315, 319, 335	261, 305+351 +338
d4-CA	81-25-4	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
d7-Cholesterol	83199-47-7	Avanti Polar Lipids, Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
DHCA	81-23-2	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
3-DHCA	2304-89-4	Steraloids Inc.	07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+ 338
7-DHCA	911-40-0	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
12-DHCA	2458-08-4	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
DHLCA	1153-56-6	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
6,7-DKLCA	-	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
7,12-DKLCA	-	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
FAME-Mix (Supelco 37 Components)	602-004-00-3	Sigma Aldrich Chemie GmbH	08	351	291

Fortsetzung TABELLE I-11

	CAS-Nr.	Hersteller	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
d4-GCDCA	-	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
GCDCA, Na-Salz	16564-43-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
GCA, Hydrat	1192657-83-2	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
GDCA, Na-salz	360-65-6	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
GLCA	24404-83-9	Steraloids Inc.	07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
GUDCA	64480-66-6	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
Heptadecansäure	506-12-7	Merck Chemicals GmbH	07	315, 319, 335	261, 305+351+338
HCA	547-75-1	Steraloids Inc	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
HDCA	83-49-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	302, 315, 319	261, 280, 305+351+338, 304+340, 405, 501
Iso-DCA	566-17-6	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
7-KLCA	4651-67-7	Steraloids Inc.	07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
12-KLCA	-	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Iso-LCA	1534-35-6	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
LCA	434-13-9	Sigma Aldrich Chemie GmbH	08	341, 361, 303	280, 201, 312, 308+313, 501
Methanol, LC-MS-Grade	67-56-1	Carl Roth GmbH & Co. KG	02, 06, 08	225, 301+311+337, 370	210, 260, 280, 301+310, 311
<i>n</i> -Hexan	110-54-3	Carl Roth GmbH & Co. KG	02, 07, 08, 09	<i>n</i> -Hexan	110-54-3
Nonadecansäure	646-30-0	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	315, 319, 335	261, 305+351+338
2-Propanol	67-63-0	Carl Roth GmbH & Co. KG	02, 07	225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
T- α -MCA, Na-Salz	25696-60-0	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
T- β -MCA, Na-Salz	-	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
TCDCa, Na-Salz	6009-98-9	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
TCA, Na-Salz Hydrat	345909-36-4	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	315, 319, 335	280, 305+351+338
TUDCA, Na-Salz Hydrat	207737-97-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	315, 319, 335	302+352, 305+351+338, 304+340, 312, 280

Fortsetzung TABELLE I-11

	CAS-Nr.	Hersteller	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
TUDCA, Na-Salz Hydrat	207737-97-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH	07	315, 319, 335	302+352, 305+351+338, 304+340, 312, 280
THDCA	38411-85-7	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
TLCA, Na-Salz	6042-32-6	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
TUDCA, Na-Salz	14605-22-2	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
tert-Butylmethyl-ether	1634-04-4	Carl Roth GmbH & Co. KG	02, 07	225-315	210-302+352
Trimethylsulfonium-hydroxid	17287-03-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	02, 06, 08	225, 301, 311, 315, 319, 331, 370	210, 260, 280, 301+310, 305+351+338, 311
UDCA	128-13-2	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
α -MCA	2393-58-0	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
β -MCA	2393-59-1	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
ω -MCA	-	Steraloids Inc.	Keine Einstufung gemäß Herstellerangaben und Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle I-12 Verwendete Verbrauchsmaterialien

	Hersteller	Spezifikation
Vial-(Crimp)-Deckel	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	1.3 mm, PTFE
Drehverschlussdeckel	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Schraubkappe, 10 mm, PP
Glasvial	Wicom Germany GmbH	1.5 ml, klar
Galsvials (Schraubgewinde)	Wicom Germany GmbH	1 mL, klar, 10 mm Schraubgewinde
Inlets	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	konisch, 0.25 mL, 12 mm, klar
Einmal-Kanülen	B. Braun Melsungen AG	Sterican [®] Standardkanüle, 2 mL
Einmal-Spritzen	B. Braun Melsungen AG	Inject solo, 2 mL
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co	Pyrogenfrei, 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L
PTFE-Einmalfilter	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Chromafil O-20/25, Porengröße 0.2 μ M, Filterdurchmesser: 25 mm
Reagiergefäße (Vial)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	1.5 mL, 2 mL, PP
Septen	Wicom Germany GmbH	10 mm, PTFE
SPE-Kartuschen	Agilent Technologies [®]	Bond Elut C18
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co.	Pyrogenfrei, 15 mL & 50 mL, PP

3.3 Geräteverzeichnis

Tabelle I-13 Verwendete Geräte.

	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage	Satorius AG	Modell 1602004
GC-FID	Hewlett Packhard Inc.	HP6890 Series GC System, Software: ChemStation von Agilent Rev.A.10.02 [1757]
Gefrierschrank	Eppendorf AG	New Brunswick Scientific, Ultra low temperature freezer -86 °C
HPLC (API4000 QTRAP®)	Agilent Technologies®	Degasser: (G13798); Quaternäre Pumpe: 1260 Infinity Quaternary LC System (G1312B); Autosampler: 1200 High Performance Autosampler SL+ (G1367D); Säulenofen: Thermostated Column Department (G1316B)
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG	Research Plus, Volumina 1-20 µL, 10-100 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL
Kühlschrank	Bosch GmbH	Explosionssgeschützter Innenraum
Lyophylle	Martin Christ GmbH	Typ: Alpha 1-4 LSC, Gefriertrocknung für bis zu 4 kg
Massenspektrometer API4000 QTRAP®	SCIEX	ESI-MS/MS, Pulse-counting channel electron multiplier (CEM) detector
Probenkonzentrator	Bibby Scientific Limited	Stuart® Sample Concentrator SBH CONC/1
Ultra-Turrax	VWR International GmbH	S12 N - 7S
Ultraschallgerät	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Sonorex Super, Ultraschallfrequenz 35kHz
Vortex	VWR International GmbH	Digital Vortex Mixer, 230 V
Zentrifuge	Eppendorf AG	Centrifuge 5810 R, für Proben von 1,5 – 50 mL

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Ort, Datum

Katrin Kuprat