



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Charakterisierung eines synthetischen Leoligin-Derivates
hinsichtlich seiner FXR-agonistischen Wirkung in Leber-
und Darmzellen“

verfasst von / submitted by

Ulrike Kirchweger

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Verena M. Dirsch

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Dr. Angela Ladurner

Zusammenfassung:

Der Farnesoid X Rezeptor (FXR) ist ein nukleärer Rezeptor und wird in erster Linie in der Leber und im letzten Abschnitt des Dünndarms, dem Ileum, exprimiert. Der FXR greift in verschiedene Stoffwechselwege regulierend ein: So regelt er unter anderem den Lipid- und Glucosehaushalt und verbessert die Insulinsensitivität. Darüber hinaus steuern Gallensäuren als endogene Liganden des FXR über diesen Rezeptor ihre eigene Synthese. Aufgrund dieser vielfältigen, unterschiedlichen Wirkungen wäre ein Einsatz neuer FXR-Agonisten als potenzielle Arzneistoffe unter anderem für Lebererkrankungen, Dyslipidämien oder Diabetes mellitus Typ 2 denkbar.

Das synthetische Leoligin-Derivat 2780, das sich von dem Naturstoff Leoligin, einem Lignan aus der Edelweisswurzel, ableitet, wurde in der Arbeitsgruppe mittels Luciferase Reporter Assay untersucht und als FXR-Agonist identifiziert.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, den Einfluss dieses Leoligin-Derivates auf verschiedene Cholesterintransporter und die Proteine SHP und FGF19, die eine wichtige Rolle im Gallensäurehaushalt spielen, in Leber- (HepG2) und Darmzellen (Caco-2) zu testen.

Dazu wurden die Zellen mit den LXR-Agonisten GW3965 und T0901317, den FXR-Agonisten CDCA und GW4064, dem Derivat 2780 sowie mit DMSO (als Negativkontrolle) behandelt. Die erhaltenen Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen übertragen und die gewünschten Proteine mithilfe von Antikörpern darauf nachgewiesen. Es konnte jedoch bei diesen Experimenten keine relevante Veränderungen der Expressionsraten durch das Leoligin-Derivat 2780 festgestellt werden.

Abstract:

The farnesoid X receptor (FXR) is a nuclear receptor, which is primarily expressed in the liver and in the final section of the small intestine, the ileum. The FXR plays a key role in various metabolic pathways including the lipid and glucose metabolism and also ameliorates insulin resistance. Furthermore, bile acids, as the endogenous ligands of FXR, regulate their own synthesis through the activation of this receptor. Due to this variety of effects on different pathways it is easily conceivable that new FXR agonists could be used in the treatment of hepatic diseases, dyslipidemia or diabetes mellitus type 2.

The synthetic leoligin derivative 2780, whose structure is derived from the naturally occurring substance leoligin, a lignan from the roots of edelweiss, was identified in the research group as an agonist of FXR using a luciferase reporter gene assay.

The aim of this diploma thesis was to investigate the influence of the leoligin derivative on different cholesterol transporters and the proteins SHP and FGF19, which play a major role in FXR regulated bile acid metabolism, in liver (HepG2) and intestinal (Caco-2) cells.

For this purpose the cells were treated with the LXR agonists GW3965 and T0901317, the FXR agonists CDCA and GW4064, the derivative 2780 and DMSO (as a negative control). Western blotting was used for the detection of the desired proteins. However, no notable effect of the leoligin derivative 2780 could be observed in the experiments.

INHALTSVERZEICHNIS:

A. EINLEITUNG	1
1. Nukleäre Rezeptoren	1
1.1. Allgemeines.....	1
1.2. Aufbau.....	2
1.3. Einteilung	4
2. Farnesoid X Rezeptoren	5
2.1. FXR α und FXR β	6
2.2. Metabolische Funktionen des FXR.....	7
2.2.1. FXR-Wirkung auf den Gallensäurestoffwechsel.....	7
2.2.2. FXR-Wirkung auf den Lipidstoffwechsel	10
2.3. Potenzielle klinische Anwendung von FXR-Agonisten.....	12
2.4. Modulatoren des FXR.....	13
2.4.1. Naturstoffe als Modulatoren des FXR.....	14
3. Untersuchte Proteine und deren Relevanz	14
3.1. ABCA1.....	15
3.1.1. ABCA1 in der Leber.....	15
3.1.2. ABCA1 im Darm	16
3.2. ABCG8	16
3.2.1. ABCG8 in der Leber	17
3.3. NPC1L1	17
3.3.1. NPC1L1 im Darm	18
3.4. SRB1	18
3.4.1. SRB1 in der Leber	19
3.5. FGF19	19
3.5.1. FGF19 im Darm.....	19
3.6. SHP	20

3.6.1. SHP in der Leber	21
4. Getestete Substanzen	21
4.1. DMSO	22
4.2. Positivkontrollen für LXR	22
4.2.1. GW3965	23
4.2.2. T0901317	23
4.3. Positivkontrollen für FXR	24
4.3.1. CDCA.....	24
4.3.2. GW4064	25
4.4. Leoligin-Derivat 2780.....	26
5. Ziel der Arbeit	28
B. MATERIAL UND METHODEN.....	29
1. Zellkultur	29
1.1. Passagieren der HepG2 Zellen	29
1.2. Aussäen der HepG2 Zellen.....	30
1.3. Stimulation der HepG2 Zellen und Lysatherstellung.....	31
1.4. Passagieren und Mediumwechsel der Caco-2 Zellen	33
1.5. Aussäen der Caco-2 Zellen.....	34
1.6. Mediumwechsel und TEER-Messung der ausgesäten Caco-2 Zellen	35
1.7. Stimulation der Caco-2 Zellen und Lysatherstellung.....	36
2. Bradford Bestimmung.....	39
2.1. Prinzip	39
2.2. Durchführung.....	40
2.3. Auswertung.....	41
3. Gelelektrophorese	42
3.1. Prinzip	42
3.2. Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese.....	42

3.3. Gele gießen	43
3.4. Elektrophoretische Auftrennung	44
4. Western Blot	46
4.1. Prinzip	46
4.2. Übertragen der Proteine auf die Membran.....	47
4.3. Detektion mittels AG-AK-Reaktion	48
5. Statistik	50
C. RESULTATE	51
1. Ergebnisse der HepG2-Western Blots.....	51
1.1. ABCA1.....	51
1.2. SHP	53
1.3. SRB1	54
1.4. ABCG8	55
2. Ergebnisse der Caco-2 Western Blots.....	57
2.1. ABCA1.....	57
2.2. FGF19	58
2.3. NPC1L1	62
D. DISKUSSION	64
E. FAZIT	67
F. REFERENZEN.....	68
G. ABKÜRZUNGEN	88

A. EINLEITUNG

1. Nukleäre Rezeptoren

Die Nukleären Rezeptoren bilden eine Überfamilie vieler phylogenetisch ähnlicher Proteine [1]. Dabei codieren 21 Gene im gesamten Genom der Fliege *Drosophila melanogaster* [2], 48 im Menschen [3], 49 in der Maus, da diese im Gegensatz zum Menschen ein zusätzliches Gen für FXR β besitzt [4], und mehr als 270 Gene im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [5] für diese Proteine.

Der erste nukleäre Rezeptor wurde 1962 von Jensen et al. gefunden. Es handelte sich dabei um den Estrogen Rezeptor [6]. In den 1980er Jahren gelang es erstmals die cDNA zweier nukleärer Rezeptoren, des Glucocorticoid Rezeptors und des Estrogen Rezeptors, zu isolieren [7, 8]. Bei einem Sequenzvergleich der beiden cDNAs wurde eine hochkonservierte Region, die aufgrund ihrer Eigenschaften später als DNA-Bindungsdomäne bekannt wurde, entdeckt [7, 9, 10]. Die Klonierung der cDNA ermöglichte nicht nur zahlreiche Experimente zur Funktion der Proteine und die Auffindung wichtiger einzelner Aminosäuren und Nukleotidsequenzen, sondern auch die Entdeckung neuer nukleärer Rezeptoren, die aufgrund fehlender bekannter Liganden „Orphan Rezeptoren“ genannt wurden [11-13]. Viele dieser Liganden konnten in den darauffolgenden Jahren mithilfe von Kotransfektions-Assays gefunden werden [14-17].

1.1. Allgemeines

Nukleäre Rezeptoren fungieren als liganden-gesteuerte Transkriptionsfaktoren, die in zahlreiche Vorgänge im menschlichen Körper regulierend eingreifen. Sie spielen unter anderem bei der Embryonalentwicklung, der Zelldifferenzierung und dem Zelltod und der Homöostase vieler metabolischer Prozesse im menschlichen Körper eine Rolle [18, 19].

Neben den klassischen Steroidhormonrezeptoren, die zumeist in erster Linie für die Regulation des hormonellen Gleichgewichtes, aber auch zum Beispiel für die

Aufrechterhaltung eines stabilen Blutdruckes zuständig sind [20], spielen vor allem viele frühere „Orphan Rezeptoren“ eine zentrale Rolle bei zahlreichen Stoffwechselwegen. So greifen der Farnesoid X Rezeptor (FXR), der Liver X Rezeptor (LXR) und auch die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) stark in die Aufnahme, den Umbau, die Verwertung, aber auch die Synthese sowohl von exogen zugeführten Nährstoffen als auch von endogenen Substanzen ein [21]. Der Pregnan X Rezeptor (PXR) und der „Constitutive Androstane Rezeptor“ (CAR) fungieren als Sensor für potenziell schädliche körpereigene sowie extern zugeführte Stoffe und bewirken deren Entgiftung und/oder deren Elimination [22].

Viele dieser früheren „Orphan Rezeptoren“ bilden mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) meist obligate Heterodimere, wie zum Beispiel der Liver X Rezeptor (LXR), der Farnesoid X Rezeptor (FXR) oder die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR $\alpha/\beta/\gamma$) [23]. So können einige der RXR-Heterodimere sowohl von den entsprechenden Liganden des jeweiligen nukleären Rezeptors, als auch von RXR-Agonisten wie zum Beispiel der 9-cis Retinsäure (einem Vitamin A-Derivat), dem endogenen Liganden von RXR, aktiviert werden [24-26]. Ein Beispiel dafür stellt der Liver X Rezeptor dar: Dieser bildet obligate Heterodimere mit RXR und kann nachgewiesenermaßen nicht nur durch seine eigenen endogenen Liganden, den Oxysterolen, sondern auch durch 9-cis Retinsäure stimuliert werden [27, 28]. Seinen Namen verdankt der LXR der Tatsache, dass die zuerst entdeckte Isoform des Rezeptors, der LXR α , zu einem großen Teil in der Leber exprimiert wird, wohingegen der später gefundene LXR β ubiquitär im gesamten Körper vorkommt [29]. Der LXR α spielt vor allem bei der Homöostase der Lipide eine zentrale Rolle, wo er oftmals als Gegenspieler zu FXR fungiert, während über die Funktion von LXR β noch nicht sehr viel bekannt ist [27, 30].

1.2. Aufbau

Nukleäre Rezeptoren sind im Wesentlichen sehr ähnlich aufgebaut. Sie bestehen dabei in der Regel aus 4 – 5 Einheiten, sogenannten Domänen [1]:

Am N-Terminus sitzt die **A/B Domäne**, die in ihrer Länge und Aminosäurezusammensetzung äußerst variabel ist und über mindestens eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1) und mehrere autonome Transaktivierungsstellen verfügt [1, 31].

Im Anschluss daran befindet sich die **DNA-Bindungsdomäne (DBD, C Domäne)**, die eine kurze Sequenz (P-Box) enthält, die für die Spezifität der DNA-Bindung an die entsprechenden Response Elemente (RE) wichtig ist. Sie beinhaltet außerdem zwei Zinkfinger motive und weist die höchste Konservierung aller Domänen auf [1, 31].

Die **D Domäne**, auch Hinge Element genannt, bildet den Übergang zur Ligandenbindungsdomäne und ist für die Konformationsänderung infolge einer Ligandenbindung verantwortlich [1, 31].

Am C-Terminus befindet sich die **Ligandenbindungsdomäne (LBD, E Domäne)**, die über eine liganden-abhängige Aktivierungsfunktion verfügt und unter anderem bei der spezifischen Ligandenbindung, der Dimerisierung und der Interaktion mit Coregulatoren eine zentrale Rolle spielt [1, 31].

Einige nukleäre Rezeptoren weisen zusätzlich am C-Terminus der E Domäne noch eine weitere Domäne, die **F Domäne**, auf, die in ihrer Sequenz sehr variabel ist und deren Struktur und Funktion noch unbekannt sind. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 1 dargestellt [1, 31].



Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines nukleären Rezeptors

AF-1/AF-2: Aktivierungsfunktion 1 oder 2, DBD: DNA-Bindungsdomäne, H: Hinge-Domäne, LBD: Ligandenbindungsdomäne. Modifiziert nach Germain et al. [31]

1.3. Einteilung

Nukleäre Rezeptoren werden oft aufgrund ihrer Dimerisierung und ihrer DNA-Binddefähigkeit in 4 Gruppen eingeteilt [32]:

Typ 1 Rezeptoren (Steroidhormonrezeptoren) befinden sich, mit Ausnahme des Estrogenrezeptors, im Cytoplasma, wo sie an Hitzeschockproteine gebunden sind. Nach der Ligandenbindung wird das Hitzeschockprotein abgespalten und der Rezeptor transloziert in den Zellkern und bindet dort als Homodimer an die DNA (an „inverted repeats“). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem der Androgenrezeptor, der Glucocorticoidrezeptor und der Mineralcorticoidrezeptor [19, 32].

Typ 2 Rezeptoren sind bereits im Kern lokalisiert. Bei einer Ligandenbindung bilden diese Rezeptoren Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) und binden anschließend zumeist an „direct repeats“. Hierzu zählen alle weiteren bekannten ligandengesteuerten Rezeptoren wie zum Beispiel der Thyroid-Hormon Rezeptor, der Liver X Rezeptor (LXR) oder auch der Farnesoid X Rezeptor (FXR) [19, 32].

Typ 3 Rezeptoren binden als Homodimere an „direct repeats“ und **Typ 4** Rezeptoren binden für gewöhnlich als Monomere an sogenannte „extended core sites“. In diese zwei Kategorien fallen fast alle Orphan Rezeptoren [19, 32].

Auwerx et al. empfehlen jedoch die Einteilung nach Homologie der DNA-Bindungsdomäne und der Ligandenbindungsdomäne in 6 Subfamilien, um eine einheitliche Benennung und eindeutige Zuordnung zu gewährleisten [33]:

1. Thyroidhormonrezeptor-ähnliche Rezeptoren
2. Retinoid X Rezeptoren-ähnliche Rezeptoren
3. Estrogenrezeptor-ähnliche Rezeptoren
4. Nervenwachstumsfaktor IB-ähnliche Rezeptoren
5. Steroidogenic-faktor-ähnliche Rezeptoren
6. Germ Cell Kernfaktor-ähnliche Rezeptoren

So werden die einzelnen Rezeptoren zusätzlich zu ihrem Trivialnamen durch einen einheitlichen Code in der Form „NRxyz“ beschrieben. „NR“ steht dabei für nukleärer Rezeptor und die 3-stellige Kombination „xyz“ teilt die Rezeptoren nach ihrer Subfamilie (x), Gruppe (y) und ihrem codierenden Gen (z) ein. So wird zum Beispiel der FXR α in dieser Nomenklatur als NR1H4 bezeichnet [1, 34].

Alle weiteren Rezeptoren, die in keine der oben genannten Gruppen passen, werden in einer weiteren Subfamilie zusammengefasst. Diese wird als Subfamilie 0 (NR0) bezeichnet [33].

2. Farnesoid X Rezeptoren

Die cDNA des Farnesoid X Rezeptors wurde 1995 im Rahmen eines groß angelegten Screenings nach neuen nukleären Rezeptoren auf Basis der starken Konservierung der DNA-Bindungsdomänen erstmals aus einer Rattenleber isoliert [35]. Eine ähnliche cDNA wurde etwas später auch aus einer Mäuseleber geklont [36]. Aufgrund fehlender bekannter Liganden wurde der FXR zunächst zu den „Orphan Rezeptoren“ gezählt. Benannt wurde der Farnesoid X Rezeptor damals infolge einer schwachen Aktivierung durch Farnesol, welches als Diphosphat als Vorläufersubstanz in der Cholesterinbiosynthese beim Menschen fungiert, und dessen Derivat Juvenilhormon III, das ausschließlich in Insekten auftritt [35]. 1999 wurden schließlich Gallensäuren als die endogenen Liganden von FXR identifiziert, weswegen der Rezeptor mitunter auch als Gallensäuren-Rezeptor („Bile acid receptor“, BAR) bezeichnet wird [37-39].

Der Farnesoid X Rezeptor ist nahe mit dem Ecdysteron Rezeptor (EcR), der in Anthropoden vorkommt, verwandt. Dieser ist nur als EcR-ultraspiracle (USP) Heterodimer physiologisch aktiv, wobei USP in *Drosophila* das entsprechende Gegenstück zu RXR im Menschen darstellt. Dadurch lag die Annahme nahe, dass FXR ebenfalls ein Heterodimer mit RXR bildet, was sich in einem Zwei-Hybrid-System Versuch in Säugerzellen bestätigte [35].

Der FXR ist hauptsächlich in der Leber, den Nieren, im Darm und in den Nebennieren exprimiert, wo er in eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen eingreift [35].

2.1. FXR α und FXR β

Obwohl zumeist von dem Farnesoid X Rezeptor gesprochen wird, existieren genau genommen zwei bekannte FXR Gene: FXR α und FXR β . FXR β ist jedoch nur bei Mäusen, Ratten und Hasen ein funktionierender Rezeptor, in Menschen und Primaten aber nur ein Pseudogen [40].

Zusätzlich dazu weist auch der FXR α selbst 4 verschiedene Isoformen auf, die durch die Anwendung unterschiedlicher Promoter und alternative Spleißung entstehen: FXR α 1, FXR α 2, FXR α 3 und FXR α 4 [41]. Gelegentlich werden diese auch als FXR α 1, FXR α 2, FXR β 1 und FXR β 2 oder FXR α 1(+), FXR α 1(-), FXR α 2(+) und FXR α 2(-) bezeichnet [42, 43].

Dabei weisen FXR α 3 und FXR α 4 einen verlängerten N-Terminus, FXR α 1 und FXR α 3 zusätzliche vier Aminosäuren in der Hinge-Domäne direkt angrenzend an die DNA-Bindungsdomäne auf. Eine schematische Darstellung der Isoformen findet sich in Abbildung 2 [41].

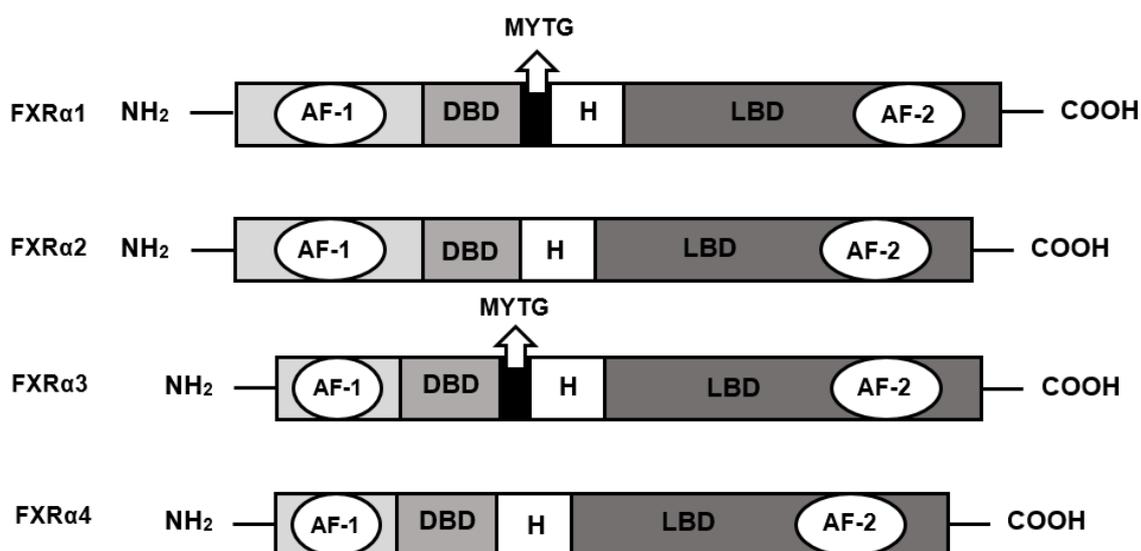


Abbildung 2: Schematische Abbildungen des Aufbaus der vier Isoformen von FXR α
 Modifiziert nach Lee et al. [41]

Grundsätzlich sind Gallensäuren ein Abbauprodukt von Cholesterin, weswegen sie ein Steroidgrundgerüst besitzen, das eine oder mehrere Hydroxylgruppen und zusätzlich noch eine Carboxylgruppe in der Seitenkette aufweist [52]. Die primären Gallensäuren Chenodesoxycholsäure und Cholsäure werden in der Leber synthetisiert. Ihre Strukturen sind in Abbildung 3 abgebildet. Die sekundären Gallensäuren erhält man zum einen durch die Umwandlung von CDCA und CA durch die bakterielle 7α -Dehydroxylase in Desoxycholsäure und Lithocholsäure, zum anderen durch Epimerisierung der 7α -Hydroxygruppe von CDCA in Ursodesoxycholsäure [54].

Die Synthese der primären Gallensäuren erfolgt in der Regel über zwei verschiedene Wege [54, 55]:

- **Klassischer (neutraler) Weg:** Hierbei wird Cholesterin zuallererst im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch CYP7A1, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym, in Position 7α hydroxyliert und anschließend zu 7α -Hydroxy-4-Cholesten-3-on isomerisiert. Um Cholsäure als Endprodukt zu erhalten, muss 7α -Hydroxy-4-Cholesten-3-on zusätzlich durch CYP8B1 in Position 12α hydroxyliert werden. Falls dieser Schritt ausbleibt, entsteht Chenodesoxycholsäure. Danach werden beide Zwischenprodukte im Cytosol reduziert und dehydrogeniert und die Seitenkette daraufhin in den Mitochondrien durch CYP27A1 hydroxyliert. Abschließend wird die Seitenkette des Cholestan-Grundgerüsts zur Cholansäure β -oxidiert und die so zu gleichen Teilen entstandenen primären Gallensäuren an Taurin oder Glycin gebunden (konjugiert) [54, 55].
- **Alternativer (saurer) Weg:** Beim alternativen Weg wird im Gegensatz zum klassischen Weg mit der Hydroxylierung der Seitenkette begonnen und erst im zweiten Schritt das Grundgerüst in Position 7α hydroxyliert: Dies kann einerseits durch CYP27A1 oder Sterol-25-Hydroxylase und anschließend durch CYP7B1, andererseits durch CYP46A1 (im Gehirn) und darauffolgende Hydroxylierung durch CYP39A1 erfolgen. In der Leber

werden diese Oxysterole abschließend hauptsächlich in CDCA umgewandelt [54, 55].

Die vereinfachte Darstellung dieser Synthesewege findet sich in Abbildung 4.

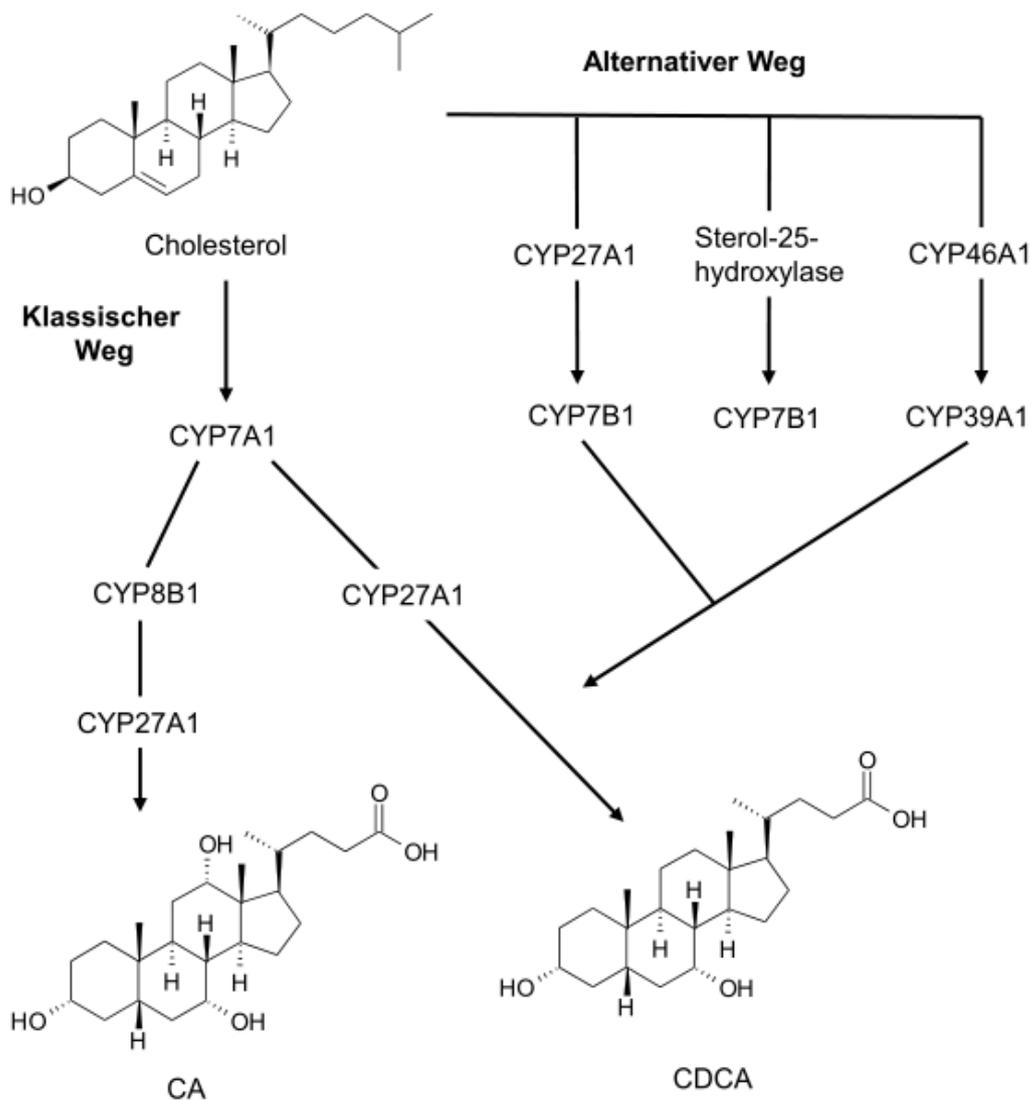


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Synthese der primären Gallensäuren
Modifiziert nach Chiang et al. (2013) [54]

Da Gallensäuren zum einen aufgrund ihrer Struktur im Körper toxisch wirken können und zum anderen ihre Synthese sehr aufwendig ist, unterliegen sie dem enterohepatischem Kreislauf: Sie werden in der Leber synthetisiert und dann an Taurin oder Glycin gebunden (konjugiert), um sie einerseits weniger toxisch und andererseits besser löslich zu machen, bevor sie anschließend in die Gallenblase sezerniert werden. Aus der Gallenblase wird die Galle dann pulsatil in den Darm

freigesetzt, wo ein Teil der Konjugate gespalten und ein Großteil der Gallensäuren wiederaufgenommen wird. Über die Pfortader werden diese dann wieder zur Leber transportiert und stehen für einen neuen Zyklus bereit. Auf diese Weise können ungefähr 95 % der Gallensäuren konserviert werden [52, 54].

Als endogene Liganden des FXR hemmen Gallensäuren ihre eigene Produktion über dessen Aktivierung („negatives Feedback“-Hemmung). So reguliert der Farnesoid X Rezeptor die Synthese der Gallensäuren auf zwei unterschiedliche Wege: Einerseits kommt es durch die Aktivierung von FXR zu einer vermehrten Expression von Small Heterodimer Partner (SHP), das dann zu einer Inhibierung der Enzyme CYP7A1 und CYP8B1 über die Hemmung der Transaktivierung des LRH-1 („Liver receptor homolog-1“) und des HNF4 α („Hepatocyte nuclear factor 4 alpha“) führt. Andererseits führt eine FXR-Aktivierung in den Enterozyten des Darms zu der Bildung von FGF19 („Fibroblast growth factor 19“), welches basolateral in den portalen Kreislauf sezerniert, zur Leber transportiert und über den „Fibroblast growth factor receptor 4“ (FGFR4) in die Leber aufgenommen wird. In der Leber bewirkt diese Aktivierung des FGFR4 ebenfalls eine Hemmung von CYP7A1. Der genaue Mechanismus dieser Inhibierung ist zum derzeitigen Stand noch nicht vollständig geklärt, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass es durch die Aktivierung von FGFR4 zu einer Phosphorylierung und somit einer Aktivierung des MAP-Kinase-Weges kommt und das dies möglicherweise zu der Inhibierung von CYP7A1 führt [52, 54, 55]. Zusätzlich dazu beeinflusst der Farnesoid X Rezeptor die Expression verschiedener Transporter, die für den Import oder Export von Gallensäuren sorgen, wie zum Beispiel der BSEP („bile salt export pump“) oder der Organo-Anion-Transporter (OATPs), aber auch von Enzymen wie CYP3A4, das als Mitglied der Cytochrom P450-Familie in erster Linie für die Metabolisierung von Fremdstoffen und Steroiden zuständig ist [45, 56].

2.2.2. FXR-Wirkung auf den Lipidstoffwechsel

Essentielle Fettsäuren sind Fettsäuren, die nicht selbst vom Körper produziert werden können, und stellen wichtige Vorläufersubstanzen für die Synthese von endogenen Verbindungen wie zum Beispiel Eicosanoiden dar. Des Weiteren sind freie Fettsäuren eine wichtige Energiequelle [57]. Cholesterin wiederum ist auf-

grund seiner Struktur und seiner Eigenschaften beispielsweise zum einen ein Vorläufermolekül für Steroidhormone und Gallensäuren, zum anderen wird es für den Aufbau von Zellmembranen verwendet [58].

Cholesterin wird zum größten Teil endogen von der Leber gebildet, aber auch zu einem geringeren Anteil aus dem Darm aufgenommen. Triglyceride können ebenfalls einerseits vom Körper selbst aus Kohlenhydraten hergestellt werden, andererseits werden aus der Nahrung stammende Triglyceride im Dünndarm durch die pankreatische Lipase in Glycerin und die freien Fettsäuren (FFS) gespalten, da sie nur so in die Enterozyten aufgenommen werden können. Dort werden sie dann wieder zu Triglyceriden zusammengebaut und bilden gemeinsam mit Cholesterin und verschiedenen Phospholipiden die Chylomikronen aus. Die Chylomikronen werden anschließend ins lymphatische System sezerniert und gelangen darüber in die Blutbahn. Sie werden dann vor allem im Fett- und Muskelgewebe, aber auch im Herz durch die Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert, wodurch FFS, Glycerin und Cholesterin freigesetzt werden. Die Überreste („remnants“) der Chylomikronen werden dann zur Leber transportiert und aufgenommen [57]. Lipoproteine unterschiedlicher Dichte (VLDL, IDL, LDL) transportieren dann Cholesterin und andere lipophile Verbindungen von der Leber ausgehend in periphere Gewebe, wohingegen HDL diese aus der Peripherie zurück zur Leber bringt (reverser Cholesterintransport) [59]. Im gesunden Menschen sind sowohl die Synthese sowie die Aufnahme, als auch der Abbau stark reguliert, da überschüssiges Cholesterin und zu viele freie Fettsäuren für den Körper schädlich sein können und das Risiko einer Atherosklerose erhöhen [58].

Eine Aktivierung des Farnesoid X Rezeptors (durch Gallensäuren) führt dabei zu einer Senkung des Triglyceridspiegels: Einerseits kommt es zu einer erhöhten Clearance über die LPL durch die Induktion ihrer Aktivatoren ApoC-II und ApoA-V, die Hemmung ihres Repressors ApoC-III und die vermehrte Expression von VLDL-Rezeptoren. Andererseits aktiviert der FXR auch den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha (PPAR α), der die β -Oxidation (und somit den Abbau) von Fettsäuren fördert, und hemmt zudem auch dessen Synthese über eine Inhibierung des hepatischen „Sterol regulatory element-binding protein-1c“ (SREBP-1c) [44, 45, 52].

Darüber hinaus weisen FXR-defiziente Mäuse neben erhöhten Triglyceridwerten auch gesteigerte Cholesterin-, LDL-, aber auch ApoA-I- und HDL-Spiegel auf. Zusätzlich dazu sind die Level an Scavenger-Rezeptor B1 (SRB1), welcher häufig auch als HDL-Rezeptor bezeichnet wird, in FXR-defizienten Mäusen reduziert. Im Gegensatz dazu führt eine Gabe von FXR-Agonisten erwünschterweise einerseits zu einer Reduktion von Triglyceriden, Cholesterin und LDL. Andererseits kommt es durch die Verabreichung zu einer erhöhten Aktivität des Cholesterinester-Transferproteins (CETP) und zu verringerten ApoA-I- und HDL-Spiegeln sowie zu einer vermehrten Expression von SRB1. Der genaue Wirkmechanismus der Verbesserung des Lipidprofils ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt [44, 45, 52].

2.3. Potenzielle klinische Anwendung von FXR-Agonisten

Aufgrund seiner zahlreichen Wirkungsweisen steht der Farnesoid X Rezeptor im Fokus vieler verschiedener Forschungen zur therapeutischen Anwendung. So stellen Lebererkrankungen wie eine primäre biliäre Zirrhose (PBC) und andere cholestatische Erkrankungen und die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) sowie die Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) mögliche Anwendungsgebiete für FXR-Agonisten dar. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass ein Einsatz solcher Substanzen für die Therapie von mit Hepatitis-assoziierten fibrotischen Veränderungen sowie zur schnelleren Regeneration nach Lebertransplantationen und die Prophylaxe und Behandlung von Gallensteinen denkbar und sinnvoll wäre. Darüber hinaus könnten FXR-Modulatoren als neuartiges Therapiekonzept bei Dyslipidämien, Atherosklerose sowie zur Verbesserung eines Diabetes mellitus Typ 2 mit assoziierter Insulinresistenz verabreicht werden. Überdies reguliert der FXR auch die Absorption von Gallensäuren im Darm und hemmt zugleich ein übermäßiges Bakterienwachstum [60].

2.4. Modulatoren des FXR

Seit der Entdeckung des Rezeptors und dessen endogener Liganden, den Gallensäuren, wurde eine Reihe weiterer Modulatoren synthetisiert und erforscht. Aufgrund der zahlreichen erwünschten Wirkungen des FXR wurden vor allem Agonisten generiert [61-63].

Ausgehend von den natürlich vorkommenden Gallensäuren wurden einige weitere potente Agonisten synthetisiert: Zumeist wurde Chenodesoxycholsäure (CDCA), der stärkste endogene Ligand, als Grundlage für die weiteren Agonisten ausgewählt. Die am besten erforschte Substanz wurde durch die Substitution einer Ethylgruppe an der Position 6 α von CDCA generiert [61-63]. Die so erzeugte 6-ECDCA ist auch unter den Namen INT-747 oder Obeticholsäure bekannt. Sie befindet sich zum einen unter anderem in der klinischen Testung für die Therapie einer nichtalkoholischer Fettlebererkrankung, zum anderen ist sie unter dem Namen „Oclavia“ für die Behandlung einer primären biliären Zirrhose (NCT02308111) bereits zugelassen [63-65].

Da die Gallensäuren jedoch aufgrund ihrer Struktur als Arzneistoffe meist eher problematisch und nicht sehr selektiv sind, wurde nach nichtsteroidalen Verbindungen gesucht, die den FXR ebenfalls stark aktivieren. Eine der ersten bekannten, nichtsteroidalen Substanzen ist GW4064, das sich jedoch aufgrund seiner geringen Bioverfügbarkeit und toxikologischer Probleme *in vivo* nicht für die Anwendung an Menschen eignet. Daraufhin wurden von verschiedenen Firmen unzählige Analoga von GW4064 generiert, von denen sich nach derzeitigem Stand noch keines in einer klinischen Testung befindet [61-63].

Der nächste identifizierte, nichtsteroidale FXR-Agonist mit hoher Affinität ist Fexaramin, welches in Mäusen zu einer selektiven Aktivierung von FXR Target-Genen im Darm und somit zu einer Verringerung eines Übergewichtes und einer Insulinresistenz [66]. Danach wurden einige Azepin-Derivate, Pyrazolidin-3,5-dione, Benzimidazol-Derivate sowie synthetische Retinoide (AGN-31, AGN-29) synthetisiert, von denen jedoch derzeit ebenfalls noch keines in klinischen Studien angewendet wird [61-63].

2.4.1. Naturstoffe als Modulatoren des FXR

Neben den synthetischen Modulatoren zeigen auch viele Naturstoffe eine agonistische oder antagonistische Wirkung am FXR [63].

So weist das Guggulipid Guggulsteron aus dem Gummiharz des Balsambaumes *Commiphora mukul* (Hook. ex Stocks) Engl. eine antagonistische Wirkung am FXR auf, andererseits steigert die Substanz die mRNA-Level von BSEP und SHP, weswegen die Substanz als selektiver Gallensäurenmodulator bezeichnet wird [63, 67]. Eine Terpensäure („6 β -Hydroxy Nigranoic Acid“) aus der Kletterpflanze *Schisandra glaucescens* Diels wiederum ist ausschließlich ein FXR-Antagonist [63].

Daneben wirken viele andere Naturstoffe als (selektive) FXR-Agonisten:

So reguliert der Gerbstoff (-)-Epigallocatechin-3-gallat selektiv die Expression von SHP und BSEP. Des Weiteren weisen unter anderem 3 Triterpene (Ergosterolperoxid, Ganodermanontriol und Ganoderiol F) aus dem Pilz *Ganoderma lucidum*, die Triterpene Alisol M 23-acetat und Alisol A 23-acetat aus dem asiatischen Froschlöffel *Alisma plantago-aquatica subsp. orientale* (Sam.) Sam. (Synonym: *Alisma orientale* (Sam.) Juz.) und zahlreiche Terpene und Sterole aus Meeresschwämmen und Stachelhäutern [63]. Überdies zeigt auch Xanthohumol, ein prenyliertes Flavonoid aus dem Hopfen *Humulus lupulus* L., eine FXR-agonistische Wirkung [62].

3. Untersuchte Proteine und deren Relevanz

Um die Wirkung des Leoligin-Derivates 2780 in Leber- und Darmzellen zu testen, wurden verschiedene Proteine, die besonders bei einer verminderten oder vermehrten Expression vorrangig Auswirkungen auf den Lipid- und Gallensäurehaushalt haben, ausgewählt, da diese zwei Hauptangriffspunkte von FXR darstellen [45].

3.1. ABCA1

1994 wurde ABCA1, damals noch ABC1 genannt, erstmals erwähnt. Es handelt sich dabei um ein Membranprotein aus der Familie der „ATP binding cassette“-Transporter (ABC-Transporter), das aufgrund seiner Funktion auch als „Cholesterin Efflux regulierendes Protein“ (CERP) bekannt ist [68, 69]. Das Protein kommt zwar ubiquitär im Körper vor, ist jedoch besonders stark in der Leber, dem Darm, der Lunge, in der Plazenta und im fetalen Gewebe exprimiert [70]. 1998 fanden Forscher heraus, dass eine Mutation des ABCA1-Proteins für die Tangier-Krankheit, die mit einer vermehrten Cholesterineinlagerung und verringerten HDL-Spiegeln verbunden ist, verantwortlich ist [71, 72]. In einem Mausmodell der Erkrankung konnte des Weiteren auch ein Einfluss auf Reproduktion und die neonatale Sterblichkeit, die Lipid- und Steroidhormonspiegel sowie die Entstehung einer membranproliferativen Glomerulonephritis und einer koronaren Herzerkrankung festgestellt werden [73]. Obendrein verringert ABCA1 die Level an ApoE und beta-Amyloid und stellt somit ein neues Target in der Alzheimer-Forschung dar [74].

3.1.1. ABCA1 in der Leber

In der Leber steigert ABCA1 den Cholesterin-Efflux und sorgt so unter anderem für erhöhte Spiegel an Triglyceriden, freiem Cholesterin und HDL-Cholesterin [75]. In *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Leber, genauer gesagt der hepatische ABCA1-Transporter, essentiell für die HDL-Bildung ist und dadurch auch die VLDL Sekretion gesenkt wird [76, 77]. Obendrein stellten Oku et al. fest, dass die HDL- und ABCA1-Level in Adiponektin-defizienten Mäusen, die verstärkt zu Atherosklerose neigen, verringert sind [78]. Ghanbari-Niaki et al. konnten bei Ratten eine signifikante Erhöhung von ABCA1 und HDL durch die sportliche Betätigung auf einem Laufband erzielen [79]. Bei LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen mit einer ABCA1-Überexpression beobachteten Joyce et al. darüber hinaus erhöhte Lipid- und Lipoprotein-Spiegel in der Leber [80]. Des Weiteren konnten Ma et al. nachweisen, dass es bei einer (induzierten) Entzündung zu einer Lipidakkumulation in der Leber durch einen gesteigerten

LDL-Rezeptor-medierten Cholesterineinstrom und einen verminderten Cholesterinausstrom durch die Herabregulation von ABCA1 kommt [81].

3.1.2. ABCA1 im Darm

Im Allgemeinen trägt ABCA1 im Darm in erster Linie zu der Aufrechterhaltung eines stabilen Plasma-HDL-Spiegels bei [82]. Khabazian et al. konnten nachweisen, dass sportliche Betätigung bei Ratten nicht nur in der Leber, sondern auch im Darm zu erhöhten ABCA1- und HDL-Spiegeln führt [83]. Plat und Mensink zeigten überdies, dass es auch durch die Gabe von Phytosterinen zu einer vermehrten Expression des ABC-Transporters im Darm kommt und somit die Cholesterinaufnahme gesenkt wird [84]. Ansonsten sind die Aufgaben und Wirkungen des intestinalen ABCA1-Transporters noch weitgehend unerforscht.

3.2. ABCG8

Das Transportprotein ABCG8 gehört, genauso wie ABCA1, zu der Familie der „*ATP binding cassette*“-Transporter (ABC-Transporter). ABCG8 bildet mit ABCG5 ein obligates Heterodimer (Sterolin), welches in erster Linie für den Efflux von Cholesterin und Phytosterinen aus der Leber und dem Darm zuständig ist [85, 86]. So führt eine Mutation einer der beiden zu Sitosterolämie, einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung, bei der vermehrt Cholesterin, vor allem aber auch Sitosterol und andere Phytosterine aufgenommen und eingelagert werden [87, 88]. Für gewöhnlich verhindert ABCG8 die Akkumulation von Lipiden durch einen vermehrten Cholesterin Efflux, eine Verringerung des reversen Cholesterin Transports und durch eine verminderte Aufnahme von Pflanzensterinen im Darm [86]. Weitere zahlreiche Polymorphismen von Sterolin haben daneben Einfluss auf die Plasmacholesterinspiegel, die Cholesterinabsorption und die Insulinsensitivität sowie die Entstehung oder das gehäufte Vorkommen von Diabetes mellitus Typ 2, von ischämischen Gefäßerkrankungen, von koronaren Herzerkrankungen und von Gallensteinen und Gallenkrebs [89-94].

3.2.1. ABCG8 in der Leber

In der Leber sorgt das ABCG8/ABCG5-Heterodimer hauptsächlich dafür, dass Cholesterin und andere Sterole unter Beteiligung des biliären Phospholipidtransporters MDR2 (multidrug resistance protein 2, ABCB4) in die Galle sezerniert werden [95, 96]. Die essentielle Rolle des Heterodimers bei der biliären Cholesterinsekretion wurde durch Yu et al. einerseits durch Versuche mit Knockout-Mäusen, andererseits mit transgenen Mäusen, die eine Überexpression von ABCG5 und ABCG8 aufwiesen, bestätigt [97, 98]. Aufgrund seiner Wirkungen in der Leber, aber auch im Darm wird ABCG8 gelegentlich auch als Gegenspieler von NPC1L1 bezeichnet [99]. Überdies konnten Khovidhunkit et al. zeigen, dass die Level von ABCG5 und ABCG8 bei einer Infektion oder einer Entzündung, die durch Endotoxine (Lipopolysaccharide) ausgelöst wurde, reduziert werden [100]. Darüber hinaus führen erhöhte Level von ABCG8 einerseits sogar schon bei normalgewichtigen Patienten, die keine erhöhten Blutfettwerte aufwiesen, vermehrt zu Gallensteinen, andererseits verringern sie die Entstehung von Atherosklerose und einer nichtalkoholischen Fettleber [101-103].

3.3. NPC1L1

Aufgrund einer großen Ähnlichkeit mit dem Gen des Niemann Pick C1 Proteins wurde das neu gefundene Gen Niemann Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1) genannt [104]. Es gibt zwei verschieden gespleißte Varianten von NPC1L1, jedoch ist über die physiologische Bedeutung dieser alternativen Spleißung derzeit noch nichts bekannt [105]. Andererseits werden Mutationen und unterschiedliche Varianten von NPC1L1, bei denen die Aktivität des Transporters verringert wird, unter anderem mit einem verringerten Risiko für koronare Herzerkrankungen und ischämischen Gefäßerkrankungen, jedoch einem erhöhten Risiko für Gallensteine assoziiert [106-109]. Darüber hinaus ist der Transporter ein mögliches neues Target in der Therapie von Hepatitis C, da NPC1L1 einen entscheidenden Faktor für die Aufnahme des Virus in die Wirtszellen darstellt [110].

3.3.1. NPC1L1 im Darm

Im Darm ist das Niemann Pick C1-like Protein 1 vorrangig im Jejunum, zu geringeren Anteilen aber auch im Duodenum und Ileum lokalisiert. So findet sich NPC1L1 sowohl in Caco-2 Zellen als auch im menschlichen Dünndarm besonders angereichert in der „Brush-Border Membran“, die eine wesentliche Rolle bei der Lipidabsorption spielt [111]. So führte eine Überexpression von NPC1L1 in Zellkulturen zu einer erleichterten Cholesterinaufnahme, wohingegen NPC1L1-defiziente Mäuse eine verminderte Aufnahme von Cholesterin und Phytosterolen aus dem Darm aufzeigten [112-114]. Ezetimib, das in erster Linie zur Cholesterinsenkung eingesetzt wird, bewirkt diese durch eine verminderte Cholesterinaufnahme im Darm, indem es die Sterol-induzierte Internalisierung von NPC1L1 verhindert [115, 116]. Zusätzlich konnten einerseits Valasek et al. nachweisen, dass auch Fenofibrat über die Aktivierung des PPAR α die intestinale NPC1L1-Expression in Mäusen reduzieren kann, andererseits zeigten Tremblay et al., dass eine Gabe von Atorvastatin bei Männern mit Hyperlipidämie zu einer erhöhten Expression des Proteins im Darm geführt hatte [117, 118]. Des Weiteren konnte eine Studie belegen, dass das Niemann Pick C1-like Protein 1 auch die Vitamin K-Aufnahme im Darm reguliert und somit den antikoagulativen Effekt bei einer Warfarin Therapie moduliert [119].

3.4. SRB1

Der Scavenger-Rezeptor B1 (SRB1) ist ein integrales Membranprotein, das als Rezeptor für HDL fungiert [120]. Der Rezeptor ist beim Menschen in der Leber, in der Nebenniere, im Darm und in Makrophagen in den Gefäßwänden exprimiert [121, 122]. Im Darm ist der Transporter in den Mikrovilli der apikalen Plasmamembran lokalisiert, wo er eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Cholesterin und Vitamin E aus der Nahrung spielt [123-126]. In der Nebenniere reguliert er die Steroidbiosynthese durch die selektive Aufnahme von HDL-Cholesterinestern [127]. Überdies wird SRB1 aufgrund verschiedener Wirkmechanismen als potenzielles Target in der Behandlung von Artherosklerose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehandelt [120, 128-130]. Zusätzlich dazu wird die Expression des Scavenger-Rezeptors B1 von den Sexualhormonen oder auch von bakteriellen

Lipopolysacchariden in unterschiedlicher Weise beeinflusst und spielt möglicherweise eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen [131].

3.4.1. SRB1 in der Leber

Die Expression des Scavenger-Rezeptors B1 in der Leber (vor allem in den Parenchymzellen) wird vermutlich durch Hormone, Zytokine und Nahrungsfette reguliert [127, 131]. Er bewirkt dort eine selektive Aufnahme von Cholesterinestern, freiem Cholesterin und Lipiden aus HDL [120, 132], eine vermehrte Sekretion von Cholesterin in die Galle [132] und ermöglicht den reversen Cholesterintransport [131]. Darüber hinaus erleichtert er zum einen die Verstoffwechslung von Chylomikronen [133] und VLDL [134], zum anderen korreliert die Expression des Rezeptors auch mit der Produktion von VLDL [135]. Zusätzlich greifen neben den Lipoproteinen und Lipiden auch anionische Phospholipide an dem Rezeptor an [136]. Obendrein ist SRB1 ein entscheidender Faktor für die Aufnahme von Hepatitis C Viren und Plasmodien, den Erregern von Malaria, in die Leber, weswegen der Transporter ein weiteres Target für die Therapie dieser Infektionserkrankungen darstellen könnte [137, 138].

3.5. FGF19

Der „Fibroblast growth factor 19“ (FGF19) ist das menschliche Ortholog zu FGF15 in der Maus [139]. Er wird bei einer Aktivierung von FXR von Enterozyten im Darm gebildet und gelangt über die Pfortader und den „Fibroblast growth factor receptor 4“ (FGFR4) mithilfe von β -Klotho in die Leber, wo es die Gallensäuresynthese über eine Hemmung von CYP7A1 unterdrückt [140-142].

3.5.1. FGF19 im Darm

Obwohl FGF19 im Darm synthetisiert wird, entfaltet er seine Wirkung zumeist in anderen Geweben: Neben der Hemmung der Gallensäuresynthese [143] bewirkt der „Fibroblast growth factor 19“ in der Leber eine Unterdrückung der Gluconeogenese [144] sowie eine erhöhte Insulinsensitivität, verbessert Diabetes Typ 2 und induziert im Gehirn eine Insulin-unabhängige Glucosesenkung [145-

148]. Darüber hinaus senkt er die Konzentration an Lipoprotein A [149], den Cholesterin- und Triglyceridspiegel sowie das Körpergewicht von Mäusen durch eine erhöhte Metabolisierungsrate [150] und steigert die Proteinbiosynthese und Glykogensynthese in der Leber [151, 152]. Außerdem führt FGF19 zu einer Zellproliferation, die zum einen die Leberzellregeneration nach einer Resektion fördert [153], zum anderen jedoch auch die Tumorbildung begünstigt [154-159]. Aufgrund seiner zahlreichen Wirkungsweisen befinden sich derzeit einige FXR-Agonisten und eine neuentwickelte Variante des humanen FGF19 in unterschiedlichen Phasen klinischer Studien, bei denen deren Einfluss auf eine primäre biliäre Zirrhose, eine nichtalkoholische Fettlebererkrankung, das „short bowel syndrome“, auf die primäre und sekundäre Gallensäuremalabsorption und auf Diabetes Typ 2 getestet wird [160].

3.6. SHP

Das Protein „Small Heterodimer Partner“ (SHP, NR0B2) weist eine hohe Sequenzhomologie mit den anderen Mitgliedern der nukleären Rezeptor Superfamilie auf, ist jedoch aufgrund seiner fehlenden DNA-Bindungsdomäne kein regulärer nukleärer Rezeptor und wird deshalb in die Subfamilie 0 eingeteilt [161]. SHP wurde erstmals auf der Suche nach potenziellen Partnern für den „Orphan Rezeptor“ CAR isoliert [162]. Einerseits bildet er neben CAR auch Heterodimere mit zahlreichen anderen nukleären Rezeptoren wie zum Beispiel RXR, RAR, PPAR und dem ER [162, 163]. Dabei führt eine Interaktion von SHP mit anderen nukleären Rezeptoren zumeist zu einer Hemmung ihrer transkriptionellen Aktivität durch drei verschiedene Mechanismen: Zum einen kann er durch einen direkten Angriff an der AF-2 Domäne der nukleären Rezeptoren mit deren Koaktivatoren konkurrieren. Außerdem kann er Korepressoren rekrutieren und mit diesen gemeinsam die Transkription hemmen. Überdies kann er auch direkt mit den nukleären Rezeptoren interagieren und ihre DNA-Bindung verhindern, da der Rezeptor an dem N-Terminus seiner Ligandenbindungsdomäne eine Repressorfunktion besitzt [161, 164]. Andererseits wird auch SHP selbst durch zahllose Substanzen, Proteine und Rezeptoren in seiner Wirkung beeinflusst [165].

3.6.1. SHP in der Leber

SHP wird im Menschen vorwiegend in der Leber exprimiert. Zu sehr geringen Teilen konnte SHP mRNA auch in der Bauchspeicheldrüse, der Milz, der Nebenniere und im Dünndarm nachgewiesen werden [166]. Aufgrund seiner Vielzahl an Interaktionen mit anderen Rezeptoren, Substanzen und Proteinen liegt der Schluss nahe, dass SHP in viele biologische Stoffwechselwege regulatorisch eingreift. So induzieren Gallensäuren SHP über FXR und regulieren zum einen auf diese Art ihre eigene Produktion („negative Feedback“-Hemmung) [167, 168], zum anderen reduzieren sie so auch die Triglyceridspiegel in Mäusen mit ernährungsbedingter Hypertriglyceridämie, verringern die Expression des humanen Angiotensinogen-Gens, welches eine Vorstufe von Angiotensin II darstellt und somit einen großen Einfluss auf den Blutdruck hat, verbessern eine Leberfibrose bei Ratten und führen zu einer verminderten Gluconeogenese [169-172]. Darüber hinaus erhöhen Gallensäuren die Stabilität von SHP, indem sie deren durch Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Abbau verzögern [173]. Ein durch Metformin-Gabe ausgelöster Anstieg von AMPK steigerte ebenfalls die SHP-Level und führte somit einerseits zu Unterdrückung der Gluconeogenese durch das „cAMP response element-binding protein“ (CREB), das in diesem speziellen Fall als Transkriptionsfaktor am Ende der Signalkaskade bei einer Stimulation des Glucagonrezeptors fungiert, und andererseits zu einer Verbesserung der hepatischen Insulinresistenz [174, 175]. Weiteren scheint SHP sehr wichtig für zahlreiche weitere Stoffwechselvorgänge: So werden Mutationen von SHP zum Beispiel mit einer leichten bis moderaten Fettleibigkeit sowie mit einer speziellen Form von Diabetes (MODY) assoziiert und beeinflussen möglicherweise das Geburtsgewicht, den „Body Mass Index“ (BMI) und die Insulinsekretion [161].

4. Getestete Substanzen

Um eine Veränderungen der Proteinlevel einem bestimmten Rezeptor eindeutig zuweisen zu können, wurden zur Testung der Proteine sowohl LXR- als auch FXR-Agonisten ausgewählt, da beide Rezeptoren in Leber und Darm exprimiert werden und dort in ähnliche Stoffwechselwege eingreifen [176]. Die Substanzen

wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, weshalb DMSO als Negativkontrolle verwendet wurde. Die Substanzen sind in Abbildung 5 dargestellt.

4.1. DMSO

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein organisches Lösungsmittel, das aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften sehr gerne als Vehikel für Substanzen in der Forschung angewendet wird. DMSO wirkt antiphlogistisch, analgetisch und abschwellend bei stumpfen Traumen und Blutergüssen [177-181]. Aufgrund dieser und weiterer zusätzlicher Eigenschaften von DMSO, wie zum Beispiel der Wirkung als Radikalfänger, wurde es für eine Vielzahl von Krankheiten eingesetzt [182]. Obwohl es die Hautbarriere und andere Zellmembranen sehr leicht und schnell passieren kann ohne diese dabei zu zerstören, wird es aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung in höheren Konzentrationen hauptsächlich nur noch als Hilfsstoff wie beispielsweise als Trägersubstanz für Analgetika oder Zytostatika in topischen Zubereitungen verwendet [183, 184]. In der Zellkultur wird es zudem in Kombination mit Glycerin zur Kryokonservierung der Zellen verwendet [182]. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung in höheren Konzentrationen wurde darauf geachtet, DMSO in einer nur sehr geringen Konzentration, als 0,1% -ige Lösung, für die Zellkultur-Versuche zu verwenden, um eine potentielle Schädigung der Zellen auszuschließen [184].

4.2. Positivkontrollen für LXR

GW3965 und T0901317 wurden als Positivkontrollen für eine LXR-medierte Wirkung gewählt, da diese den Rezeptor bereits im nanomolaren Bereich selektiv stimulieren [185, 186]. Des Weiteren weist T0901317 zusätzlich eine FXR-agonistische Wirkung auf, die jedoch deutlich schwächer ist als seine LXR-agonistische Wirkung [187].

4.2.1. GW3965

GW3965 ist ein synthetischer, nichtsteroidaler, voller LXR α -Agonist. Die Substanz weist Kreuzreaktivitäten mit LXR β und PXR auf, wobei LXR mehr als 10-fach selektiver aktiviert wird als PXR. So steigert GW3965 bei oraler Gabe von 10 mg/kg die ABCA1-Level im Dünndarm und den peripheren Makrophagen und somit auch die HDL-Spiegel in Mäusen [186, 188]. Des Weiteren kommt es nach einer Behandlung mit der Substanz *in vitro* einerseits zu einer Steigerung von ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen [189], andererseits zu einer Proliferationshemmung in glatten Muskelzellen [190]. Bei Mäusen mit Schlaganfall zeigte GW3965 nicht nur bei „early-onset“ Therapie (10 min bis 2 h nach dem Vorfall), sondern auch bei subakuter Gabe (nach 24 h) eine neuroprotektive Wirkung [191]. In weiteren Mausmodellen kam es durch die Gabe von GW3965 unter anderem zu einer Unterdrückung der Gluconeogenese, einer vermehrten Expression der Glucokinase in der Leber sowie zu einer verbesserten Glucosetoleranz [192], zu einer Entzündungshemmung [193] und zu einer Reduktion atherosklerotischer Läsionen [189]. Zusätzlich kam es bei fettleibigen Mäusen (ob/ob) zu einer veränderten Fettverteilung und einer verringerten Expression und Sekretion von proinflammatorischen Markern [194].

4.2.2. T0901317

T0901317 ist ein weiterer synthetischer, nichtsteroidaler LXR-Agonist [185]. Zusätzlich zu seiner LXR-agonistischen Wirkung weist T0901317 eine potente FXR-agonistische [187] und PXR-agonistische Wirkung auf [195] und ist ein inverser Agonist des „Constitutive Androstan Rezeptors“ [196]. Des Weiteren wurde die Substanz als inverser Agonist am ROR α und am ROR γ („Retinoic acid receptor-related orphan receptor“) identifiziert [197]. T0901317 verhinderte bei einer intraperitonealen Verabreichung an Tieren die Entstehung von Fettleibigkeit und von einer mit Fettleibigkeit assoziierten Insulinresistenz und Glucoseintoleranz [198]. In verschiedenen weiteren Mausmodellen führte die Gabe dieses LXR-Agonisten zu einer vermehrten Expression von NPC1L1 und ABCA1 [199], zu einer gesteigerten Lipogenese, einer verminderten Expression von ApoA5 und zu erhöhten Plasmalipid-Spiegeln durch die Hochregulierung von SREBP-1c [185, 200, 201].

Des Weiteren kann T0901317 zum einen die Entstehung von Atherosklerose in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen verhindern [202], zum anderen die atherosklerotischen Läsionen in der Aorta von ApoE^{-/-} Mäusen reduzieren [199]. Darüber hinaus verringert eine Behandlung mit T0901317 einerseits sowohl *in vitro*, als auch in einem Alzheimer-Mausmodell die Bildung von Beta-Amyloid [203], andererseits verringert es einen durch hohe Glucose-Spiegel induzierten oxidativen Stress, die Zerstörung von Mitochondrien sowie den programmierten Zelltod (Apoptose) in Kardiomyozyten [204]. Außerdem zeigt die Substanz in mehreren menschlichen Krebs-Zelllinien eine antiproliferative Wirkung [205, 206].

4.3. Positivkontrollen für FXR

CDCA und GW4064 wurden als Positivkontrollen für einen FXR-medierten Effekt genommen, da einerseits CDCA der stärkste endogene Ligand und andererseits GW4064 ein besonders selektiver, hochpotenter Agonist von FXR ist [207, 208].

4.3.1. CDCA

Chenodesoxycholsäure (CDCA) ist eine der wichtigsten Gallensäuren und darüber hinaus der stärkste endogene Ligand des Farnesoid X Rezeptors [207]. So wurden bereits in den 1970er Jahren Studien zu der Wirkung von CDCA durchgeführt: Fromm et al. zeigten, dass eine Gabe der Gallensäure positive Effekte auf die Größe und Anzahl der Gallensteine, auf eine Cholesterinübersättigung der Galle sowie auf die Triglyceridspiegel insbesondere bei Patienten mit Hypertriglyceridämie vorweist [209]. Iser et al. konnten später durch ihre Untersuchungen beweisen, dass eine „Resistenz“ gegenüber Chenodesoxycholsäure, die zumeist bei fettleibigen Patienten aufgetreten war, häufig durch eine Erhöhung der Standarddosis überwunden werden konnte [210]. Miller et al. und Bateson et al. konnten in weiteren Studien ebenfalls eine triglyceridsenkende Wirkung bei Patienten mit Hypertriglyceridämie nachweisen [211, 212]. Darüber hinaus bewirkte eine Gabe von CDCA eine verminderte Aufnahme von Cholesterin aus der Nahrung und vermutlich dadurch eine verminderte Sättigung der Galle mit Cholesterin [213]. Der Substanz wurde obendrein eine immunsuppressive Wirkung

durch eine Unterdrückung der Proliferation von Monozyten, sowie eine dosisabhängige Hemmung von Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) belegt [214, 215]. Überdies stoppt Chenodesoxycholsäure das Wachstum und vermindert die Adhärenz von *Helicobacter Pylori* im Magen [216]. Zusätzlich konnten einerseits Floch et al. eine Wachstumshemmung der getesteten Darmbakterienstämme durch die unkonjugierte Form der Gallensäure nachweisen [217], andererseits bewiesen Sorg und Sonenshein, dass CDCA als einzige Gallensäure die Sporenreifung von *Clostridium difficile* effektiv verhindert [218]. Außerdem konnte durch die Verabreichung von Chenodesoxycholsäure vermutlich aufgrund einer reduzierten Bildung von Protoporphyrin in der Leber eine Verbesserung von Erythropoetischer Protoporphyrinurie erzielt werden [219].

4.3.2. GW4064

GW4064 ist ein synthetischer, nichtsteroidaler, voller FXR-Agonist. Nach derzeitigem Wissensstand weist die Substanz keine weiteren bedeutenden Kreuzreaktivitäten mit anderen Rezeptoren auf [208]. So führte eine Behandlung mit GW4064 durch die Stimulation von FXR sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* zu einer erhöhten Expressionsrate des VLDL-Rezeptor Gens in der Leber [220]. Des Weiteren bewirkte die Substanz unter anderem eine Verringerung der Alanin-Aminotransferase (ALT), der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Lactat-Dehydrogenase (LDH), eine Reduktion der nekrotischen Areale sowie eine verminderte entzündliche Aktivität und verringerte Proliferation der Gallengänge und somit einen schützenden Effekt auf die Leber in cholestatischen Ratten [221]. GW4064 verringerte in Mäusen mit nichtalkoholischer Fettleber eine durch Endotoxine hervorgerufene Entzündung und reduzierte die Level an proinflammatorischen Zytokinen durch eine verminderte Aktivierung von Makrophagen [222]. Darüber hinaus kam es durch die Gabe des synthetischen FXR-Agonisten zu einer Unterdrückung der Gewichtszunahme, der Entstehung einer Fettlebererkrankung und einer Insulinresistenz bei Mäusen mit sehr fettreicher Ernährung [223]. In weiteren Studien zeigte sich, dass die Substanz außerdem einerseits zahlreiche G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie zum Beispiel die Histamin-Rezeptoren moduliert [224], andererseits die Expression und die Aktivität des Enzyms CYP3A4 vermutlich durch die Erhöhung der Level von SHP senkt [225].

Zusätzlich dazu führt eine Aktivierung von FXR durch GW4064 zu einem verminderten Bakterienwachstum im distalen Dünndarm von Mäusen [226] und zu einer Hemmung des Tumorwachstums in Kombination mit CDCA [227].

4.4. Leoligin-Derivat 2780

Das Leoligin-Derivat 2780 und über 150 weitere Leoligin-Derivate wurden von der Arbeitsgruppe Marko Mihovilovic (TU Wien) synthetisiert. Diese Derivate wurden dann mittels *in silico*-Screening Methoden von der Arbeitsgruppe von Daniela Schuster (Universität Innsbruck) vorselektiert und jene dann auf deren Wirkung auf FXR-Target Gene untersucht, wobei sich das Leoligin-Derivat 2780 als stärkster Agonist herausstellte. Aufgrund vorheriger positiver Ergebnisse des Vorläufermoleküls Leoligin in THP-1 Makrophagen wurden die Effekte des Derivates zuerst ebenfalls in dieser Zelllinie erforscht: Dabei konnte einerseits ebenfalls eine Erhöhung der ABCA1-Level nachgewiesen, andererseits die FXR-agonistische Wirkung in einem „Gal-4 reporter gene assay“ in HEK-293 Zellen weiter bestätigt werden.

Die Vorläufersubstanz, das Lignan Leoligin, stammt aus der Wurzel der Gebirgspflanze *Leontopodium nivale subsp alpinum* Cass. (Synonym: *Leontopodium alpinum*), die im deutschsprachigen Raum meist besser als Edelweiss bekannt ist. Unterschiedliche Zubereitungen (meist aus der Wurzel der Pflanze) werden traditionell bei rheumatischen Schmerzen, Durchfall und Ruhr, sowie als Adstringens und als Mittel gegen Husten eingesetzt [228, 229].

Leoligin bewirkte bei *in vitro* Versuchen in einer Konzentration von 100 pM eine deutliche Aktivierung des Cholesterinester-Transferproteins (CETP), wohingegen eine Konzentration von 1 mM zu einer Hemmung von CETP führte. *In vivo* kam es durch die orale Gabe der Substanz ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivität jenes Transferproteins [230]. Des Weiteren hemmte Leoligin zum einen die Proliferation in vaskulären glatten Muskelzellen, indem es den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert ohne dabei Apoptose auszulösen, zum anderen verhinderte es nicht nur eine Hyperplasie der Intima Media (Gefäßinnenwand) einerseits in

5. Ziel der Arbeit

Im Zuge dieser Diplomarbeit sollte überprüft werden, ob ein Einfluss des Leoligin-Derivates 2780, das in der Arbeitsgruppe bereits als FXR-Agonist identifiziert wurde, auf verschiedene Cholesterintransporter und die Proteine SHP und FGF19, die in den Gallensäurehaushalt eingreifen, mittels Western Blot belegt werden kann.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Zellkultur

Für die Western Blots wurden einerseits humane Leberzellkarzinomzellen (HepG2) als Zellkulturmodell für die Leber, andererseits humane epitheliale Kolorektalkarzinomzellen (Caco-2) als Modell für den menschlichen Dünndarm verwendet, da diese in ihrer Expression und Zelldifferenzierung dem menschlichen Vorbild sehr ähnlich sind. Beide Zelltypen sind kontinuierliche Zelllinien und wachsen adhärent, wobei die Caco-2 Zellen in einem sogenannten Transwell-System auf einer semipermeablen Filtermembran kultiviert wurden, um dem natürlichen Vorbild, dem Darm, möglichst nahe zu kommen.

Alle Arbeitsschritte, mit Ausnahme der optischen Kontrolle, wurden in der Sterilwerkbank HERAsafe® KS18 ausgeführt, um unter möglichst keimarmen Bedingungen arbeiten zu können. Dazu wurde zunächst die Arbeitsfläche der Werkbank mit 1 % Hexaquart® und anschließend mit 70 % Ethanol gereinigt und desinfiziert. Weiters wurden auch alle Gegenstände und Behälter mit 70 % Ethanol eingesprüht, bevor sie unter die Laminar Air Flow gestellt wurden. Es wurden nur sterile einzeln verpackte oder autoklavierte Materialien verwendet. Die Nährmedien und Lösungen wurden vor Gebrauch ca. 20-30 min in einem auf 37 °C temperiertem Wasserbad vorgewärmt, abgetrocknet und vor dem Einbringen in die Sterilwerkbank ebenfalls rundherum mit 70 % Ethanol besprüht. Jeder Abfall, der noch lebende Zellen enthielt, wurde mit 1 % Hexaquart® behandelt, um diese abzutöten.

1.1. Passagieren der HepG2 Zellen

Zur Kultivierung der HepG2 Zellen wurden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen mit HepG2 Wachstumsmedium ausgesät und dreimal pro Woche passagiert, um eine vollständige Konfluenz der Zellen zu vermeiden. Die HepG2 Zellen wurden vor und nach jeder Passage mikroskopisch auf Kontamination kontrolliert und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der optischen Kontrolle des Mediums und mikroskopischer Überprüfung der Konfluenz und des Zellwachstums sowie die Prüfung auf etwaige sichtbare Verunreinigungen wurde unter der Sterilwerkbank weitergearbeitet. Zunächst wurde das alte Medium vorsichtig abgegossen, danach wurden 12 ml PBS auf die der Zellen gegenüber gelegenen Seite pipettiert und die Flüssigkeit langsam über die Zellen bewegt, um die Reste des alten Mediums zu entfernen. Das PBS wurde darauffolgend ebenfalls abgegossen und die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, um sie von der Zellkulturflasche abzulösen. Dazu wurden 3 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen pipettiert und vorsichtig über dem gesamten Zellrasen verteilt und nachfolgend für 5 min in den Inkubator gestellt. Nachdem alle Zellen nach sanftem Klopfen gegen die Seitenwände abgelöst waren, wurden 7 ml Medium dazu pipettiert und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Ca. 1 ml dieser Zellsuspension wurde anschließend zum Ermitteln der Zellzahl in ein Vi-Cell™-Röhrchen transferiert und dann im Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer mit Trypanblau vermischt und fotografisch vermessen. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden 6×10^6 lebende Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und 12 ml Medium dazu pipettiert. Abschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop noch einmal kontrolliert und dann in den Inkubator gegeben.

1.2. Aussäen der HepG2 Zellen

Um ausreichend Zellen für die nächsten Schritte zur Verfügung zu haben, wurden an einem Freitag oder Montag statt nur 6×10^6 Zellen die doppelte Anzahl an Zellen (also 12×10^6) in eine 175 cm²-Zellkulturflasche, in der bereits 25-30 ml Medium vorgelegt wurde, transferiert. Das Aussäen fand für gewöhnlich Montag oder Mittwoch morgens im Anschluss an das Passagieren statt, wobei die Zellen mit 30 ml PBS gewaschen, mit 5 ml Trypsin/EDTA abgelöst und diese Reaktion mit 15 ml Medium gestoppt wurde. Zum Aussäen der Zellen wurde eine 6-Well Platte verwendet, wobei in jedes Well 1×10^6 lebende Zellen in einem Volumen von 5 ml gegeben wurden. Zum Schluss wurden die Zellen sanft in einer Achterform bewegt, um sie gleichmäßig über die gesamte Fläche des Wells zu vertei-

len, und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor sie am nächsten Tag mit den gewünschten Substanzen stimuliert wurden.

1.3. Stimulation der HepG2 Zellen und Lysatherstellung

24 h nach dem Aussäen wurde vorsichtig das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, bevor die Zellen einmal mit je 2 ml „Stripped Medium“ gewaschen wurden. Daraufhin wurde 1,5 ml „Stripped Medium“ je Well zugegeben und die Platte für 1 h inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je 750 µl „Stripped Medium“ in 6 Eppendorfgefäße (Eppis) vorgelegt und pro Eppi je 3 µl einer 1000x konzentrierten Substanz hinzugefügt, um eine Verdünnung zu erhalten, die nur noch 4x konzentriert war, und jene dann gevortext. Nach Ablauf der Zeit wurden je 500 µl der vorbereiteten Substanzverdünnungen in das entsprechende Well dazu pipettiert und die Platte nochmals sanft in einer Achterform bewegt, um die Substanz gleichmäßig auf den Zellen zu verteilen. Nun wurden die Zellen erneut für 24 h in den Inkubator gestellt. Das Stimulationsschema der HepG2 Zellen ist in Abbildung 6 dargestellt.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, dann pro Well 200 µl der vorbereiteten und auf Eis gestellten RIPA-Lysepuffer zugegeben und die Platte anschließend 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Well gelöst und die Lysate in frische 1,5 ml-Eppis überführt. Die Lysate wurden daraufhin 2x 10 sek auf Eis sonifiziert und 15 min bei 13000 Umdrehungen pro Minute in einer auf 4 °C gekühlte Zentrifuge geklärt. Nun wurde der Überstand in neue Eppis pipettiert ohne dass das Zellpellet mit abgehoben wurde, bevor die Proben bei -20 °C verstaut werden konnten. Die Materialien und Geräte, die für die einzelnen Arbeitsschritte für die HepG2 Zellen notwendig waren, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

B. MATERIAL UND METHODEN

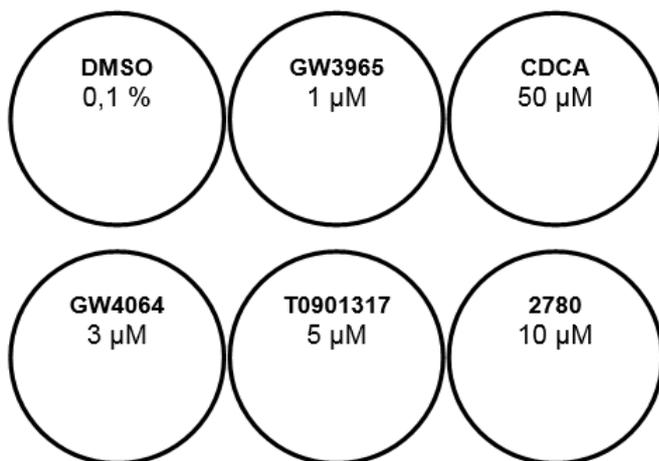


Abbildung 6: Stimulationsschema der HepG2 Zellen (Konzentrationen sind Endkonzentrationen)

Tabelle 1: Material und Geräte für das Passagieren, Aussäen und die Stimulation der Zellen sowie der Lysatherstellung (Konzentrationen der Medienbestandteile in den Klammern sind Endkonzentrationen)

HepG2 Wachstumsmedium	L-Glutamin	5 ml (2 mM)
	Penicillin & Streptomycin	5 ml (100 U/ml & 100 µg/ml)
	FBS, hitzeinaktiviert	50 ml (10 %)
	DMEM ohne Phenolrot mit 4,5 g/l Glucose (Lonza)	500 ml
PBS <i>Für 1 Liter</i>	NaCl	7,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,48 g
	KH ₂ PO ₄	0,43 g
	pH auf 7,4 einstellen und autoklavieren	
Trypsin/EDTA	Trypsin	0,5 g
	EDTA	0,2 g
	PBS	1000 ml
Stripped Medium	L-Glutamin	5 ml (2 mM)
	Penicillin & Streptomycin	5 ml (100 U/ml & 100 µg/ml)
	FBS, hitzeinaktiviert und mit Aktivkohle gefiltert	25 ml (5 %)
	DMEM ohne Phenolrot mit 4,5 g/l Glucose (Lonza)	500 ml
Substanzen	DMSO	0,1 %
	GW3965	1 mM in 0,1 % DMSO
	CDCA	50 mM in 0,1 % DMSO
	GW4064	3 mM in 0,1 % DMSO
	T0901317	5 mM in 0,1 % DMSO
	2780	10 mM in 0,1 % DMSO
RIPA-Lysepuffer	RIPA-Puffer	1504 µl
	Complete	64 µl (25 mM)

	PMSF(Phenylmethylsulfonylfluorid)	16 µl (100 mM)
	NaF (Natriumfluorid)	8 µl (200 mM)
	Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovanadat)	8 µl (200 mM)
RIPA-Puffer	NaCl	438,3 mg (150 mM)
	Tris-HCl	394,0 mg (50 mM)
	Nonidet P 40 (=NP40/IGEPAL CA 630)	500,0 mg (1 %)
	Deoxycholat (=Natriumsalz der Desoxycholsäure)	125,0 mg (0,25 %)
	SDS (Sodiumdodecylsulfat)	50,0 mg (0,1 %)
	ddH ₂ O	ad 50 ml
Technische Geräte:		
HERAcell ® 150 Incubator		
HERAsafe ® KS18		
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer		
Julabo® SW23 Schüttelwasserbad		
VWR® Mini Vortexer		
VWR® Galaxy Mini Centrifuge/VWR® MiniStar silverline Centrifuge		
Bandelin Sonopuls HD2070		
Thermo Scientific Heraeus™ Fresco™ 21 Centrifuge/Heraeus™ Biofuge fresco		

1.4. Passagieren und Mediumwechsel der Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zellen wurden ebenfalls in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit Caco-2 Wachstumsmedium gezüchtet und zweimal pro Woche (montags und donnerstags) passagiert. Dabei wurden die Zellen jeweils vor und nach der Passage im Mikroskop auf ihr Wachstum und etwaige Kontaminationen überprüft und im Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C gelagert.

Bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % wurden die Caco-2 Zellen passagiert. Nach der optischen Kontrolle wurde in der Sterilwerkbank zuerst das alte Medium entfernt, bevor die Zellen mit 12 ml PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen pipettiert und die Flasche für 5 min in den Inkubator gestellt. Danach wurden noch anhaftende Caco-2 Zellen durch sanftes Klopfen abgelöst und 7 ml Medium zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Von dieser Zellsuspension wurde ca. 1 ml in ein Vi-Cell™-Röhrchen überführt und dann im Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer ausgezählt. Abschließend wurden montags 1 x 10⁶ und donnerstags 0,5 x 10⁶ lebende Zellen in eine neue 75 cm²-

Flasche mit 12 ml Wachstumsmedium ausgesät und diese dann in den Inkubator gegeben.

Beim Medienwechsel, der mittwochs und freitags durchgeführt wurde, wurde das alte Medium abgegossen und mit 12 ml Frischem ersetzt und anschließend wieder inkubiert.

1.5. Aussäen der Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zellen wurden immer nur donnerstags im Anschluss an das Passagieren ausgesät. Dazu wurde in jedes Well einer 12-Well-Platte mit einer autoklavierten Pinzette je ein Filtereinsatz eingesetzt. Daraufhin wurde apikal (in die Filtereinsätze) je 0,5 ml, basolateral je 1,8 ml basolaterales Medium gegeben und dieses 2 min einwirken gelassen, um den Filter zu befeuchten. Danach wurde von den Membranen das Medium mit einer Gel-Ladespitze, die aufgesteckt auf eine blaue Pipettenspitze mit dem Vakuumschlauch verbunden war, abgesaugt. Darauffolgend wurden auf elf von zwölf Filtermembranen 0.06×10^6 Zellen pro cm^2 ausgesät und durch sanftes Schütteln verteilt. Der zwölfte Filtereinsatz wurde nur mit basolateralem Medium gefüllt, da dieser in den darauffolgenden Wochen als Leerwert für die TEER-Messung verwendet wurde. Die Platte wurde anschließend für 3 h in den Inkubator gestellt, damit die Zellen absinken und sich an der Filtermembran anhaften konnten. Nach dieser Zeit wurde bereits das erste Mal auf der apikalen Seite (im Filtereinsatz) das Medium gewechselt, um die Ausbildung eines Multilayers zu verhindern. Dazu wurde wieder eine autoklavierte blaue Pipettenspitze in den Vakuumschlauch gesteckt und darauf eine Gel-Ladespitze angebracht, mit der anschließend langsam an der Innenseite des Filtereinsatzes entlang bis knapp über die Filteroberfläche gefahren wurde, um das Medium abzusaugen. Anschließend wurde vorsichtig wieder je 0,5 ml basolaterales Medium auf die Zellen pipettiert und die Platte inkubiert.

1.6. Mediumwechsel und TEER-Messung der ausgesäten Caco-2 Zellen

Das Medium in den Platten wurde immer montags, mittwochs und freitags gewechselt. Dabei wurde zuerst optisch auf Kontaminationen geprüft. Dann wurde mit einer Gel-Ladespitze, die über eine blaue Pipettenspitze gesteckt und damit mit dem Vakuumschlauch verbunden war, das alte Medium vorsichtig abgesaugt. Dabei wurde zuerst mit dem Filtereinsatz ohne Zellen und dem dazugehörigem Well begonnen. Anschließend wurde das Medium aus den restlichen Wells entfernt und dann erst apikal das Medium aus den Filtereinsätzen abgesaugt. Die ersten 7 Tage wurde die Platte unter symmetrischen Bedingungen kultiviert, das heißt sowohl apikal als auch basolateral wurde ausschließlich basolaterales Medium verwendet. Am darauffolgenden Mittwoch wurde auf asymmetrische Bedingungen umgestellt, weswegen nach dem Absaugen des alten Mediums als Erstes in die Filtereinsätze 0,5 ml apikales Medium pipettiert und daraufhin in die Wells 1,8 ml basolaterales Medium gegeben wurde, bevor die Platte erneut in den Inkubator gestellt wurde.

Zusätzlich wurde während der dreiwöchigen Kultivierung zweimal mittwochs vor dem Mediumwechsel eine TEER-Messung (transepithelialer elektrischer Widerstand, transepithelial electric resistance) durchgeführt, um die Dichte des Zellverbandes zu überprüfen. Das Voltohmmeter wurde Dienstag abends mit einem Netzkabel an eine Steckdose angeschlossen, um den Akku aufzuladen. Am Mittwoch wurde das Voltohmmeter ohne Netzkabel in die Sterilwerkbank gestellt und angeschaltet. Die noch nicht angesteckte Elektrode wurde zur Desinfizierung zuerst für 20 min in ein Falcon mit 25 ml 70% Ethanol gestellt. Nach dem Herausziehen der Elektrode ließ man den Alkohol kurz verdunsten und wusch diese nacheinander in 2 Röhrchen mit vorgewärmten ddH₂O. Anschließend wurde die Elektrode bis zur Messung in ein Falcon mit vorgewärmtem apikalem Medium gestellt. Nun wurde die Funktion auf Ohm umgestellt und die Elektrode angeschlossen und weitere 10 min gewartet. Während dieser Zeit wurden apikal 300 µl apikales Medium je Well dazu pipettiert und die Platte wieder inkubiert, damit die Elektrode beim späteren Messen gleichmäßig mit Medium bedeckt war. Nach der Wartezeit wurde beginnend mit dem Well mit Filtereinsatz ohne Zellen

die Messung gestartet, um den Widerstand des Filters alleine (Leerwert) zu bekommen. Danach wurden die Werte der anderen Einsätze gemessen und notiert, um diese später in einer Excel-Tabelle auswerten zu können. Zum Messen wurde dabei das kürzere Ende in dem Filtereinsatz und die längere Elektrode im basolateralen Well platziert. Wenn nötig, wurde die Elektrode an verschiedenen Seiten des Einsatzes angesetzt um die Gleichmäßigkeit der Zellschicht zu überprüfen. Sollten sich dabei größere Unterschiede zeigen, wurde der Mittelwert dieser Werte ermittelt und notiert. Nach der Messung wurde die Elektrode abgesteckt und zuerst mit ddH₂O, dann mit 70% Ethanol und anschließend nochmals mit ddH₂O gewaschen und an einem dunklen Ort verstaut.

1.7. Stimulation der Caco-2 Zellen und Lysatherstellung

Aufgrund vorheriger Ergebnisse wurde beschlossen auf den zwei Platten einen Zeitverlauf anzulegen. Dazu wurde am 18. Tag der Kultivierung der Platte morgens eine TEER-Messung durchgeführt und danach beginnend mit dem Well ohne Zellen das alte Medium abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und auf serum-freies Medium gewechselt. Apikal wurde dabei 0,5 ml einer Mischung aus 500 ml DMEM ohne Phenolrot mit 4,5 g/l Glucose mit 5 ml L-Glutamin und 5 ml 100x NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren) auf die Zellen pipettiert. Für die basolaterale Seite wurde 0,5 g BSA (Bovines Serum Albumin) in 100 ml der obigen Mischung (FBS-freies DMEM) gegeben und gelöst und je 1,5 ml davon in jedes Well eingefüllt. So wurde die Platte weitere 24 h inkubiert. Am 19. Tag wurden die ersten zwei Wells, am 20. Tag die nächsten drei, und am 21. Tag morgens zuerst die weiteren drei und 2 h später die letzten drei mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Die Stimulation folgte immer demselben Schema: Zu Beginn wurde die Substanzmischungen zur Behandlung vorbereitet, wobei jeweils 0,6 µl der entsprechenden 1000x konzentrierten Substanz mit 300 µl FBS-freiem DMEM verdünnt wurden, womit die Substanzen nur noch 2x konzentriert waren. Daraufhin wurden das Medium aus den entsprechenden Wells basolateral und apikal abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Wells apikal mit 250 µl und basolateral mit 1,5 ml FBS-freiem DMEM gefüllt. Zum Schluss wurde in die entsprechenden Filterein-

sätze je 250 µl der gewünschten Substanzmischung dazu pipettiert und die Platte sanft bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen zu gewährleisten. Das Behandlungsschema mit Zeitverlauf ist in der Abbildung 7 dargestellt.

Am 21. Tag wurde die Zelllysate hergestellt. Dazu wurde der NP40-Lysepuffer zusammengemixt und auf Eis gestellt. Bei der ersten Platte wurden nun das apikale und das basolaterale Medium in je ein eigenes Eppendorfgefäß transferiert. Da jedoch das gesuchte Protein in den Überständen nicht nachweisbar war, wurden diese bei der zweiten Platte einfach abgesaugt. Danach wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde der Einsatz ohne Zellen weggeworfen und je 150 µl von dem zuvor bereiteten Lysepuffer in die Filtereinsätze mit den Zellen pipettiert. Nun wurde der Deckel wieder auf die Platte aufgesetzt und diese auf Eis gestellt. Diese Eisbox wurde für 30 min in einen Kühlraum bei geringer Stufe auf einen Laborschüttler gestellt. Währenddessen wurde die Zentrifuge auf 4 °C heruntergekühlt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit je einer frischen Impfhöhse von der Filtermembran gelöst und die Lysate in neue 1,5 ml-Eppis überführt und auf Eis gestellt. Die Eppis wurden für 20 min bei 4 °C und bei 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und die Überstände nachfolgend in neue Eppendorfgefäße transferiert und diese und der verbleibende Lysepuffer bei -20 °C verstaut. Die benötigten Materialien und Geräte für das Arbeiten mit den Caco-2-Zellen sind in Tabelle 2 verzeichnet.

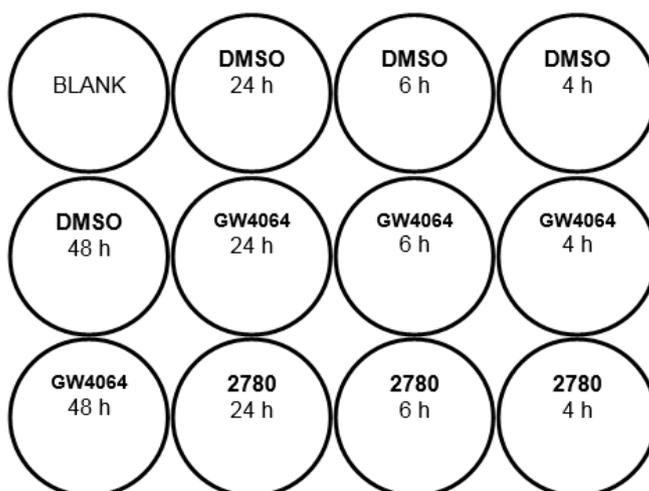


Abbildung 7: Stimulationsschema der Caco-2 Platte
(Endkonzentrationen: DMSO 0,1 %, GW4064 3 µM, 2780 10 µM)

Tabelle 2: Material und Geräte für das Passagieren, Aussäen und die Stimulation der Zellen sowie der Lysatherstellung (Konzentrationen der Medienbestandteile in den Klammern sind Endkonzentrationen)

Caco-2 Wachstumsmedium	L-Glutamin	5 ml (2 mM)
	100x NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	5 ml
	FBS, hitzeinaktiviert	100 ml (20 %)
	EMEM ohne Glutamin (Lonza)	400 ml
Basolaterales Medium	L-Glutamin	5 ml (2 mM)
	Penicillin & Streptomycin	5 ml (100 U/ml &
	100x NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	100 µg/ml)
	FBS, hitzeinaktiviert	5 ml
	EMEM ohne Glutamin (Lonza)	100 ml (20 %)
		400 ml
Apikales Medium	L-Glutamin	5 ml (2 mM)
	Penicillin & Streptomycin	5 ml (100 U/ml &
	100x NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	100 µg/ml)
	EMEM ohne Glutamin (Lonza)	5 ml
		500 ml
FBS-freies DMEM	L-Glutamin	5 ml (2 mM)
	100x NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	5 ml
	DMEM ohne Phenolrot mit 4,5 g/l Glucose	500 ml
FBS-freies DMEM mit 0,5 % BSA	FBS-freies DMEM (Lonza)	100 ml
	BSA (Bovines Serum Albumin)	0,5 g
NP40-Puffer	NaCl	150mM
	HEPES	50mM
	NP40 (=IGEPAL CA 630)	1 %
	pH 7,4	
NP40-Lysepuffer	NP40-Puffer	1880 µl
	Complete	80 µl (25mM)
	PMSF	20 µl (100mM)
	NaF	10 µl (200mM)
	Na ₃ VO ₄	10 µl (200mM)
Technische Geräte:		
HERAcell ® 150 Incubator		
HERAsafe ® KS18		
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer		
Julabo® SW23 Schüttelwasserbad		
VWR® Mini Vortexer		
VWR® Galaxy Mini Centrifuge/VWR® MiniStar silverline Centrifuge		

2. Bradford Bestimmung

Die Bradford Bestimmung ist eine nach dem US-amerikanischen Biochemiker Marion M. Bradford benannte Methode, um Proteine photometrisch zu quantifizieren.

2.1. Prinzip

Bei dem Bradford Test handelt es sich um eine kolorimetrische Bestimmung der Proteinlevel in einer Probe, bei der sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (siehe Abbildung 8) in saurer Lösung an die einzelnen Proteine anlagert, indem es mit den kationischen und unpolaren Seitenketten Komplexe bildet. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (Farbstoff ohne Protein) zu 595 nm (Farbstoff mit Protein), da das Farbstoffmolekül in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert wird und dadurch blau erscheint.

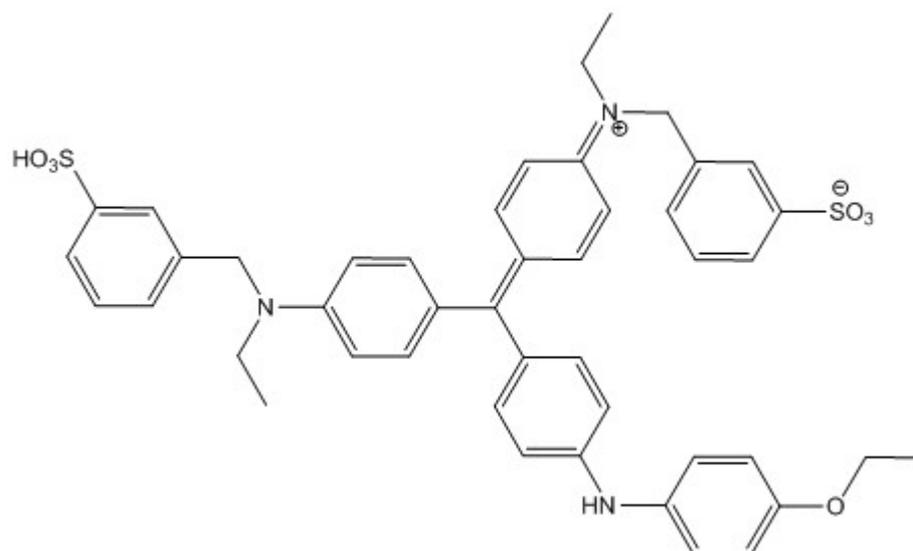


Abbildung 8: protonierte (ungebundene) Form des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue

2.2. Durchführung

Für die Bestimmung wurden je 50 µl einer 1:10 Verdünnung mit ddH₂O der einzelnen Proben und 500 µl einer 1:10 Verdünnung des entsprechenden Lysepuffers mit ddH₂O hergestellt. Als Nächstes wurde das Bradfordreagens durch Mischen der Roti®-Quant-Lösung mit ddH₂O im Verhältnis 1+3,75 in einem 50 ml Röhrchen hergestellt. Die Probenbestimmung erfolgte in einer 96-well Platte, wobei sowohl die BSA-Standards als auch die Proben jeweils als Triplets aufgetragen wurden, um etwaige Ausreißer erkennen zu können. Dazu wurden die Standards in den ersten drei Reihen von links aufgetragen, wobei zuerst je 5 µl der Probenpufferverdünnung in jedes Well dieser drei Reihen pipettiert wurde. Auf der Probenseite wurde je 10 µl ddH₂O vorgelegt und darauffolgend je 5 µl der Probenverdünnung in die entsprechenden wells dazupipettiert. Um die BSA-Standardkurve zu erhalten wurde in die oberste Reihe (A=Blank) 10 µl ddH₂O, in alle weiteren Reihen ein bereits vorgemischter BSA-Standard in aufsteigender Konzentration (Endkonzentrationen: B=2,5 µg/ml, C=5 µg/ml, D=7,5 µg/ml, E=10 µg/ml, F=15 µg/ml, G=20 µg/ml, H= 25 µg/ml) pipettiert. Dieses Pipettierschema ist in Abbildung 9 dargestellt. Danach wurde das Bradfordreagens nach erneutem kurzen Mischen auf dem Vortexmischer in eine Pipettierwanne transferiert und von dieser mit einer Multikanalpipette revers vorsichtig je 190 µl der Lösung in die entsprechenden Wells gegeben, bevor die Platte für 5-10 min auf einen Rüttler bei niedriger Stufe gestellt wurde. In der Zwischenzeit wurde das Gerät gestartet und das Programm für den Tecan Sunrise am Computer geöffnet und nach Ablauf der Zeit wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 595 nm vermessen und ausgewertet.

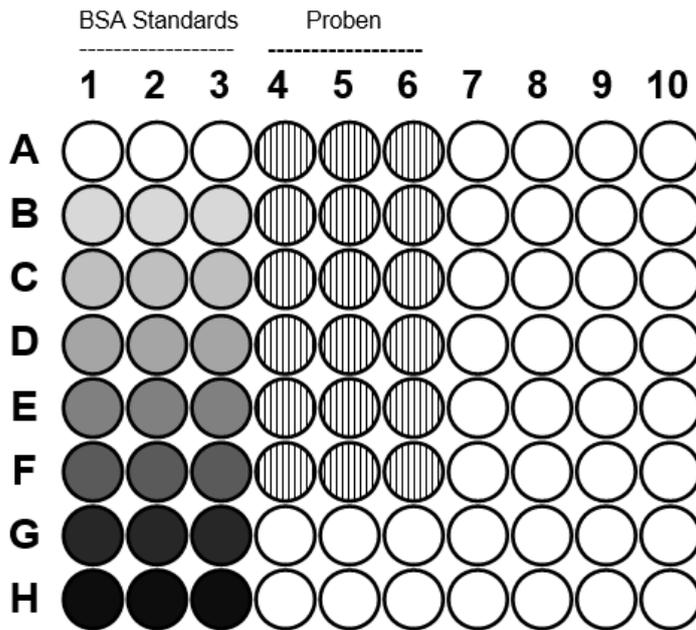


Abbildung 9: Pipettierschema für Bradford Test mit 6 Proben

2.3. Auswertung

Am Computer wurden die Mittelwerte der Triplikate gebildet und nach Erstellung einer Eichgerade mit den BSA-Standardwerten die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben ermittelt. Nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors wurden die Konzentrationen pro μl berechnet und daraus die Werte abgeleitet, um von jeder mit Probenpuffer verdünnten Probe genau 20 bzw. 30 μg Protein auf das Gel auftragen zu können. Alle benötigten Materialien, Geräte und Programme sind in Tabelle 3 vermerkt.

Tabelle 3: Materialien, Geräte und Programme für Bradford Test

Bradford-Reagens		
für 6 Proben	Roti®-Quant (Roth)	2 ml
	ddH ₂ O	7,5 ml
für 12 Proben	Roti®-Quant (Roth)	4 ml
	ddH ₂ O	15 ml
Technische Geräte und Programme:		
WPI EVOM2		
VWR® Mini Vortexer		
VWR® Galaxy Mini Centrifuge/VWR® MiniStar silverline Centrifuge		
IKA® Vibrax® VXR Basic		

Tecan Sunrise microplate reader XFluor4™ Software Microsoft Excel

3. Gelelektrophorese

Für das Prinzip der (trägerlosen) Elektrophorese wurde Arne Tiselius bereits 1948 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Es ist ein Verfahren zur Auftrennung unterschiedlicher, geladener Moleküle im elektrischen Feld. Daraus ist als Weiterentwicklung die Gelelektrophorese entstanden, welche am häufigsten für die Auftrennung von DNA, RNA oder Proteinen genutzt wird.

3.1. Prinzip

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass unterschiedliche Moleküle beim Anlegen einer Spannung solange entlang des elektrischen Feldes wandern bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreicht haben. Dieser ist abhängig von der Größe und den funktionellen Gruppen des Moleküls. Bei der Gelelektrophorese werden die Proteine zusätzlich durch das immer engmaschiger werdende Gel getrennt, weil so die größeren Proteine stärker zurückgehalten werden und nur die Kleineren weiter entlang des elektrischen Feldes wandern können. Zur Auftrennung von Proteinen ausschließlich nach der Größe wird eine SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese) durchgeführt, bei der sich SDS um die einzelnen Proteine legt und somit die Eigenladung dieser überdeckt und die Proteine linearisiert, wodurch diese dann nicht nach Ladung, sondern ausnahmslos nach der Größe im elektrischen Feld getrennt werden.

3.2. Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Um die Proben für die Gelelektrophorese vorzubereiten, wurden jeweils 60 µl der Proben in neue 1,5 ml-Eppendorfgefäße pipettiert. Danach wurde eine entsprechende Menge 3x SDS-Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol im Verhältnis 51+9 frisch zusammengemischt und je 30 µl dieser Mischung in jedes Eppi dazupipettiert und alle Eppis gevortext. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C 10 min

lang erhitzt, um die Proteine zu denaturieren, mit Ausnahme der Proben, die für die Detektion von ABCA1 genutzt wurden, da ABCA1 Aggregate bildet, die beim Erhitzen zerfallen und diese dann im Western Blot als mehrere Banden erscheinen würden. Abschließend wurden die Eppis kurz in eine kleine Zentrifuge gegeben, um die am Deckel kondensierten Tropfen wieder mit der restlichen Probe zu vereinen, und zum Schluss bei -20 °C gelagert.

3.3. Gele gießen

Für jedes Gel wurden je eine größere Glasplatte mit Abstandhaltern und je eine kleinere Glasplatte mit 70 % Ethanol (EtOH) von etwaigen Gelrückständen befreit und gereinigt. Danach wurden die beiden Platten übereinandergelegt und dieses Platten-Sandwich vorsichtig mit der kleineren Platte nach vorne zeigend zuerst in die Klammer und mit dieser in weiterer Folge gerade in die Halterung eingespannt. Nun wurde das Trenngel in der entsprechenden Konzentration vorbereitet, wobei jene von der Größe des zu detektierenden Proteins abhängig war (für sehr große Proteine mit einer Masse von mehr als 100 kDa ein 7,5 % Gel, für jene mit nur 20-70 kDa ein 10% Gel). Dazu wurden ddH₂O, Tris Puffer pH 8,8, Polyacrylamid 30% und 10 % SDS vermischt und durch Zugabe von 10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat) und TEMED (Tetramethylethylendiamin) wurde die Polymerisation gestartet. Nun wurde das Trenngel möglichst zügig und luftblasenfrei mit einer 5 ml-Pipette in den Spalt zwischen den Glasplatten pipettiert bis das noch flüssige Gel ungefähr 5-10 mm über die Oberseite der Biorad-Klemme hinausragte. Dann wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet und für ca. 1 h stehen gelassen, damit es auspolymerisieren konnte.

Nach Ablauf der Zeit wurde pro Gel je ein Kamm mit 70 % EtOH gereinigt und zur Seite gelegt, wobei für die Caco-2 Proben Kämmen mit 15, für die HepG2 Proben Kämmen mit nur 10 Vertiefungen verwendet wurden. Vor der Vorbereitung des Sammelgels wurde der sich auf dem Gel befindliche Isopropanol abgegossen und die Geloberfläche mindestens zweimal vorsichtig mit ddH₂O gespült. Nachher wurden die Innenseite der Glasplatten und die Geloberfläche so gut wie möglich mit einem Papiertuch getrocknet. Nun wurde das Sammelgel zusam-

mengemischst daraufhin möglichst luftblasenfrei mit einer 5 ml-Pipette über das bereits polymerisierte Trenngel pipettiert bis der Zwischenraum der Platten ein wenig überfüllt war. Nach dem Entfernen etwaiger Luftblasen mit der Pipette wurde der Kamm leicht schräg angesetzt und vorsichtig mit sanften Rüttelbewegungen, um mögliche Blasen an der Unterseite der Probenaschen zu vermeiden, nach unten bewegt, bis er schließlich einen geraden Abschluss mit den Platten bildete. Nach erneut ca. 1 h Polymerisation konnte das Platten-Sandwich aus der Apparatur und der Klammer entnommen werden und wurde nach einer kurzen Reinigung der Glasplatten mit ddH₂O in ein Stück Papiertuch eingewickelt. Dieses Paket wurde vorsichtig mit destilliertem Wasser befeuchtet und in eine gut verschließbare Plastiktüte gegeben und abschließend im Kühlschrank für bis zu einer Woche gelagert.

3.4. Elektrophoretische Auftrennung

Für die Elektrophorese wurden zuerst die mit dem Probenpuffer vermischten Proben und der Größenmarker aufgetaut. Anschließend wurden die gegossenen Gele mit den Kämmen nach innen zeigend in die Elektrophoresekammer eingespannt und in den Puffertank eingehängt. Danach wurde 1x Eppo-Puffer zwischen die Platten gegossen, bis dieser an der Außenseite der Gele bis knapp über der Höhe des innenliegenden Drahtes gereicht hatte. Die Kämmen wurden vorsichtig gerade nach oben herausgezogen und die entstandenen Vertiefungen mittels einer Pipette mit dem Eppo-Puffer gespült. Die Proben wurden hierauf gevortext und kurz abzentrifugiert. Nun wurde, sofern nicht alle Probenaschen gebraucht wurden, die zweite Probenasche von links mit 5 µl Größenmarker gefüllt und anschließend die einzelnen Proben nach rechts weitergehend aufgetragen. In die verbleibenden ungefüllten Vertiefungen wurde 5-10 µl 3x Probenpuffer hinein pipettiert. Nach dem vollständigen Befüllen der Probenaschen wurde abermals das Level des Eppo-Puffers kontrolliert und wenn nötig noch etwas nachgegossen. Abschließend wurde der Deckel aufgesetzt, wobei man auf die richtige Anordnung der Pole achten sollte, und das Gerät auf konstant 50 mA für 2 Gele eingestellt. Die komplette Auftrennung der Proteine dauerte ungefähr 60-90 min, währenddessen immer wieder die Lauffront überprüft wurde, um ein Aus-

laufen der Proteine aus dem Gel zu verhindern. Die Materialien und Geräte für die Vorbereitung und Durchführung der Elektrophorese sind in Tabelle 4 angeführt.

Tabelle 4: Materialien und Geräte für Gelelektrophorese

3x SDS-Probenpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	37,5 ml
	SDS	6,0 g
	Glycerin	30,0 ml
	Bromphenolblau	15,0 mg
	ddH ₂ O	ad 100 ml
Trenngel 7,5 % <i>Menge für 1 Gel</i>	ddH ₂ O	3,675 ml
	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,875 ml
	30 % Polyacrylamid (PAA) (=Rotiphorese Gel 30)	1,875 ml
	10 % SDS	75 µl
	APS 10 %	37,5 µl
	TEMED	7,5 µl
Trenngel 10 % <i>Menge für 1 Gel</i>	ddH ₂ O	3,05 ml
	Tris Puffer pH 8,8	1,875 ml
	30 % Polyacrylamid (PAA)	2,5 ml
	10 % SDS	75 µl
	APS 10 %	37,5 µl
	TEMED	7,5 µl
Sammelgel <i>Menge für 1 Gel</i>	ddH ₂ O	2,62 ml
	1,25 M Tris-HCl pH 6,8	375 µl
	30 % Polyacrylamid (PAA)	640 µl
	10 % SDS	37,5 µl
	APS 10 %	37,5 µl
	TEMED	7,5 µl
1x Epho-Puffer	10x Epho-Puffer	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
10x Epho-Puffer	Tris-Base	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	ddH ₂ O	Ad 1000 ml
Technische Geräte:		
Eppendorf® Thermomixer Compact		
VWR® Mini Vortexer		
VWR® Galaxy Mini Centrifuge/VWR® MiniStar silverline Centrifuge		

Bio-Rad PowerPac™ HC/Bio-Rad PowerPac™ Basic

IKA® RCT Basic Magnetrührer

IKA® Vibrax® VXR Basic

4. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur qualitativen und semiquantitativen Proteinbestimmung. Sie wurde bereits 1979 von J. Renart entwickelt und noch im selben Jahr von Harry Towbin vereinfacht und weiterentwickelt, obwohl der Name „Western Blot“ erst 1981 von W. Neal Burnette zur Beschreibung dieser Methode verwendet wurde. Als Western Blot bezeichnet man den Transfer der durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine feste Trägermembran und die anschließende Detektion dieser Proteine. Häufig werden allerdings nur einzelne Proteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktion (AG-AK-Reaktion) nachgewiesen.

4.1. Prinzip

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden erneut in ein elektrisches Feld eingebracht, wodurch sie wieder entlang dieses Feldes in Richtung des Pluspols wandern und so auf die feste Trägermembran übertragen werden. Daraufhin werden die verbliebenen freien Stellen mit 5 % fettfreier Milch blockiert. Zum Nachweis der gewünschten Proteine auf der Membran werden diese anschließend mit dem primären Antikörper markiert, an welchen daraufhin der zweite AK andockt. Der zweite Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, Horseradish peroxidase) konjugiert, das bei der Zugabe der ECL-Lösung das darin enthaltene Luminol mit H_2O_2 umsetzt, wobei Licht emittiert wird, welches zum Nachweis dient. Diese Reaktion ist in Abbildung 10 dargestellt.

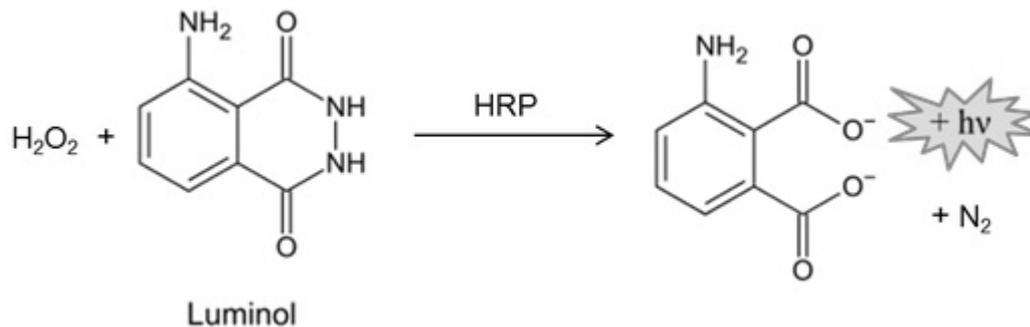


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Umsetzung von Luminol mit H_2O_2 durch HRP
 Modifiziert nach <http://www.michdiag.com/images/1.jpg> (abgerufen am 8.11.2017)

4.2. Übertragen der Proteine auf die Membran

Pro Gel wurde je eine Membran vorbereitet, indem sie nach der Beschriftung für ca. 1 min in Methanol und darauffolgend bis zum Auflegen auf das Gel in 1x Blotting-Puffer eingelegt wurde. Danach wurde der gefrorene Kühlakku in den Puffertank und die Apparatur zum Einsetzen der Blottingklammern eingehängt und ein mittelgroßes Rührfischchen am Boden des Tanks eingebracht. Nun wurde die Elektrophoresekammer geöffnet und die Platten herausgenommen. Durch Abheben einer Glasplatte und anschließendes Abtrennen des Sammelgels wurden die Gele für das Blotting vorbereitet. Dann wurde das sogenannte „Blotting-Sandwich“ gebildet: Erst wurde ein mit Blotting-Puffer getränkter Schwamm und darauf ein ebenfalls getränktes Filterpapier auf die Klammer gelegt. Anschließend wurde das Gel auf das Filterpapier gelegt. Auf das Gel wurde nun die Membran vorsichtig mit einer Pinzette aufgelegt, um die Bildung größerer Luftblasen zu verhindern. Auf die Membran wurde ein weiteres getränktes Filterpapier aufgelegt und mit einer dünnen Plastikpipette vorsichtig etwaige Luftbläschen ausgestreift. Zum Abschluss wurde ein weiterer Schwamm darauf platziert und die Klammer geschlossen und mit dem Verschluss nach unten und mit der Unterseite Richtung der schwarzen Seite der Apparatur eingespannt. Abschließend wurde der Tank auf den Magnetrührer gestellt mit Blotting Puffer gefüllt bis der Puffertank randvoll war. Schließlich wurde der Deckel entsprechend der Pole aufgesetzt und das Gerät auf 100 V konstant für 90-105 min programmiert und gestartet.

4.3. Detektion mittels AG-AK-Reaktion

Nach Ablauf der Zeit stoppte das Gerät automatisch und konnte ausgeschaltet werden. Dann wurde pro Membran eine kleine Wanne mit 5 % fettfreie Milch in 1x TBS-T vorbereitet. Anschließend wurden die Blotting-Sandwiches herausgenommen und zerlegt, damit die Membranen mit einer Pinzette abgehoben und in die Wanne mit Milch gelegt werden konnten. Die Wannen wurden daraufhin bei geringer Stufe für 2 h auf den Rüttler gestellt. In der Zwischenzeit wurden die Antikörper nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers mit 5 ml des entsprechenden Lösungsmittels in einem 50 ml Röhrchen durch sanftes Schwenken hergestellt. Die entsprechenden Verdünnungen der Antikörper sind in Tabelle 6 angeführt.

Nach der Zeit auf dem Rüttler wurde die Milch vorsichtig abgegossen und die Membranen einmal mit 1x TBS-T gespült und anschließend dreimal mit 1x TBS-T auf dem Rüttler bei mittlerer Stufe gewaschen. Nach diesen Waschgängen wurden die Membranen mit einer Pinzette durch sanftes Nachvornebiegen der Seiten in die Röhrchen mit der primären AK-Lösung transferiert, wobei zu beachten war, dass die Seite mit den geblotteten Proteinen nach innen zeigte und somit die AK-Lösung gut darüber fließen konnte. Nun wurden die Röhrchen über Nacht bei 4 °C in einen Rotor bei ca. 12-15 Umdrehungen pro Minute eingespannt.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen erneut in einer Wanne mit 1x TBS-T gespült und 3x 10 min wie oben beschrieben gewaschen. Danach wurden die Membranen in die Röhrchen mit der sekundären AK-Lösung gegeben und bei ca. 12-15 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur (RT) rotiert. Im Anschluss daran wurden die Membranen wieder mit 1x TBS-T gespült und 3x 10 min damit gewaschen. Derweil wurde der LAS3000™ eingeschaltet und in einem 15 ml Röhrchen 9 ml ddH₂O und 1 ml Tris Puffer pH 8,5 mit 50 µl Luminol, 22 µl para-Cumarsäure und 3 µl H₂O₂ vermischt (ECL-Lösung). Nachdem das TBS-T aus dem letzten Waschgang entfernt wurde, wurde die fertige ECL-Lösung über die Membran gegossen und die Wanne mit einem Deckel verschlossen. Daraufhin wurde die Wanne nochmals für 1 min auf den Rüttler gestellt und daraufhin im LAS3000™ detektiert. Anschließend wurde die Entwickler-

lösung abgegossen und zuerst nochmal mit 1x TBS-T für 10 min gewaschen, bevor der Antikörper für 12 min auf dem Rüttler mit 0,5 M NaOH von der Membran gelöst wurde. Dann wurde abermals dreimal mit 1x TBS-T gewaschen und die Membran in ein 50 ml Röhrchen mit dem primären AK gegen Aktin gegeben und über Nacht im Kühlschrank rotiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran wieder gewaschen, danach mit dem sekundären Antikörper 2 h bei RT rotiert und nach erneutem Waschen im LAS3000™ ausgewertet. Anschließend wurde einmal mit 1x TBST für 10 min auf dem Rüttler gewaschen, dann wurden die Antikörper in 12 min mithilfe von 0,5 M NaOH entfernt und erneut zweimal mit 1x TBST und danach einmal mit ddH₂O gewaschen. Abschließend wurde die Membran kurz mit ddH₂O gespült und in eine trockene Wanne transferiert und 24 h in einer Lade ausgetrocknet, bevor die Membranen in einer Wanne mit Deckel im Kühlschrank gelagert wurden. Die für den Western Blot benötigten Materialien und Geräte sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Materialien und technische Geräte für den Western Blot und den Nachweis der Proteine auf der Membran

1x Blotting-Puffer	5x Blotting-Puffer	200 ml
	Methanol	200 ml
	ddH ₂ O	600 ml
5x Blotting-Puffer	Tris-Base	15.169 g
	Glycin	72.9 g
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
1x TBS-T (Tris buffered saline Tween-20)	10x TBS-T pH 8,0	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
10x TBS-T pH 8,0	Tris-Base	30 g
	NaCl	111 g
	Tween 20	10 ml
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
ECL Entwicklerlösung	ddH ₂ O	9 ml
	1 M Tris Puffer pH 8,5	1 ml
	Luminol	50 µl (~250 mM)
	p-Cumarsäure	22 µl (~90 mM)
	H ₂ O ₂	3 µl
Technische Geräte:		
Bio-Rad PowerPac™ HC/Bio-Rad PowerPac™ Basic		

IKA® RCT Basic Magnetrührer
 IKA® Vibrax® VXR Basic
 Intelli-Mixer RM-2L Rollmischer/Rotator
 VWR® Mini Vortexer
 VWR® Galaxy Mini Centrifuge/VWR® MiniStar silverline Centrifuge

Tabelle 6: Verwendete Antikörper und deren Eigenschaften

Target (Firma + Katalognummer)	Art des Antikörpers	Molekulargewicht	Verdünnung
<u>ABCA1</u> (Novus Biologicals #B400-105)	Rabbit, polyklonal	~220 kDa	1:500 in 1x TBS-T
<u>ABCG8</u> (Novus Biologicals #NBP1-90329)	Mouse, monoklonal	~60 kDa	1:1000 in 5 % Milch
<u>FGF19</u> (R&D Systems #MAB969)	Mouse, monoklonal	~21 kDa	1:500 in 1x TBS-T
<u>NPC1L1</u> (Cell Signaling #5058 S)	Rabbit, polyklonal	~140 kDa	1:1000 in 5 % BSA
<u>SHP</u> (R&D Systems PP-#N7519-00)	Mouse, monoklonal	~30 kDa	1:1000 in 5 % Milch
<u>SRB1</u> (Novus Biologicals #NB400-104)	Rabbit, polyklonal	~82 kDa	1: 500 in 1x TBS-T
<u>Aktin</u> (#mpbio 69100)	Mouse, monoklonal	~42 kDa	1:10000 in 1x TBS-T
<u>Anti-mouse IgG</u> (Cell Signaling #7074 S)	Mouse, sekundärer AK		1:1000 in 5 % Milch
<u>Anti-rabbit IgG</u> (Cell Signaling #7076 S)	Rabbit, sekundärer AK		1:1000 in 5 % Milch

5. Statistik

Die Statistik wurde mithilfe der Software GraphPAD Prism™ Version 4.03 berechnet. Dabei wurde je eine Substanz mit DMSO (der Negativkontrolle) verglichen und um die statistische Signifikanz zu ermitteln ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Dabei wurden nur Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant gewertet. Da die Werte der einzelnen Proben oftmals sehr voneinander abwichen und die daraus resultierenden Standardabweichungen sehr hoch waren, wurde vor der Anwendung des t-Tests eine Normalisierung durchgeführt, um die interexperimentellen Schwankungen zu verringern.

C. RESULTATE

1. Ergebnisse der HepG2-Western Blots

Der Farnesoid X Rezeptor greift unter anderem stark in den Gallensäuren- und Cholesterinstoffwechsel ein. Aus diesem Grund wurden die Cholesterintransporter ABCA1, ABCG8 und SRB1, die in der Leber für die Cholesterin-Homöostase zuständig sind [86, 120, 235], sowie das Protein SHP, das die Produktion der Gallensäuren reguliert [167, 168], ausgewählt, um den Einfluss des FXR-Agonisten 2780, einem Leoligin-Derivat, auf deren Expressionsrate zu testen. Dazu wurden die HepG2 Zellen mit DMSO (Negativkontrolle), GW3965, CDCA, GW4064, T0901317 und dem Leoligin-Derivat 2780, das von der Arbeitsgruppe Marko Mihovilovic (TU Wien) bereit gestellt wurde, behandelt. GW3965 und T0901317 dienten dabei als Positivkontrolle für LXR-medierte Änderung der Expression verschiedener Proteine [186, 187], wohingegen Chenodesoxycholsäure (CDCA) als stärkster endogener Ligand und der volle, synthetische Agonist GW4064 als Positivkontrollen für FXR fungierten [40, 208]. Die Zellysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine feste Trägermembran übertragen, und dort dann mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Aktin wurde jeweils als Ladekontrolle verwendet.

1.1. ABCA1

Es ist bekannt, dass es durch eine Aktivierung des Liver X Rezeptor zu einer vermehrten Produktion des Proteins ABCA1 kommt [236]. Die Gabe von FXR-Agonisten wiederum bewirkte in zwei verschiedenen Mausmodellen einerseits eine Erhöhung der Expression der mRNA von ABCA1, andererseits jedoch führte sie über die Induktion der miRNA-144 zu einer deutlichen Verringerung der ABCA1-Level [237, 238]. In Abbildung 11 und 12 ist das Ergebnis der Immunoblots der Proben mit dem ABCA1 Antikörper graphisch dargestellt. So erhöhten die beiden LXR-Agonisten GW3965 und T0901317 wie erwartet die ABCA1 Konzentration signifikant. Eine Behandlung mit FXR-Agonisten führte zu keinem Anstieg dieser Level. Da jedoch die Zellgesundheit unter dem Mikroskop (vermutlich

aufgrund der höheren Substanzkonzentration) sichtlich beeinträchtigt war und einige Wells daraufhin aufgrund sehr geringer Proteinlevel im Bradford Test in der Elektrophorese auch nicht ausgewertet werden konnten, wurden in den nachfolgenden Experimenten die Substanzkonzentrationen verringert. Trotz dieser Umstände zeigten die Positivkontrollen für LXR eine deutliche, signifikante Steigerung der ABCA1-Level im Vergleich zu DMSO und da die Substanzen in diesen Konzentrationen häufig angewendet werden, ist davon auszugehen, dass diese nicht toxisch wirken. Aus diesem Grund wurden auch die Versuche nicht noch einmal mit den geringeren Substanzkonzentrationen wiederholt.

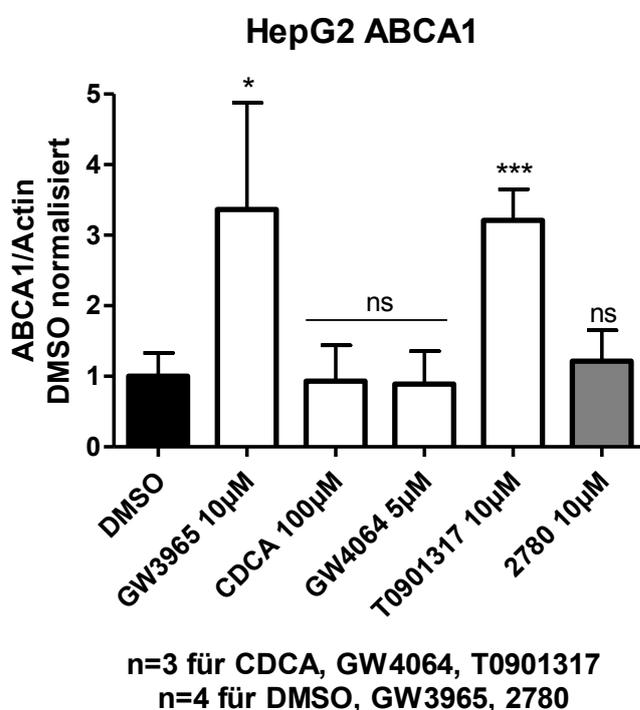


Abbildung 11: ABCA1 Proteinlevel in HepG2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

HepG2 Zellen wurden mit den in der Abbildung genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet und die daraus resultierenden Werte auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 4 Versuchen.

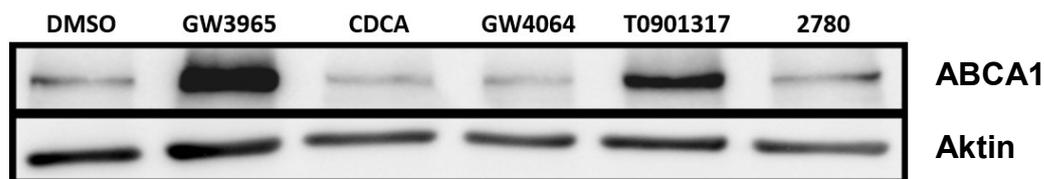


Abbildung 12: Ausschnitt des ABCA1 Proteins/Aktin eines HepG2 Western Blots
 Das ABCA1-Protein wurde bei ~250 kDa statt bei ~220 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

1.2. SHP

Durch die Stimulation von FXR kommt es in der Leber zur Bildung von SHP [168]. Über den Einfluss von LXR-Agonisten auf die SHP-Level ist derzeit nichts bekannt. Die Ergebnisse der durchgeführten Western Blots sind in Abbildung 13 und 14 dargestellt. So zeigte sich, dass der synthetische volle FXR-Agonist GW4064 wie erwartet eine signifikante Steigerung bewirkt. Erstaunlicherweise kam es durch den dualen LXR/FXR-Agonist T0901317 ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg von SHP, obwohl dieser eine geringere FXR-agonistische Wirkung als GW4064 aufweist [187]. Die FXR-Agonisten CDCA und das Leoligin-Derivat 2780 ließen keinen deutlichen Anstieg von SHP erkennen, wobei dies möglicherweise unter anderem daran liegt, dass diese beiden wesentlich schwächer wirksam sind als GW4064 [239].

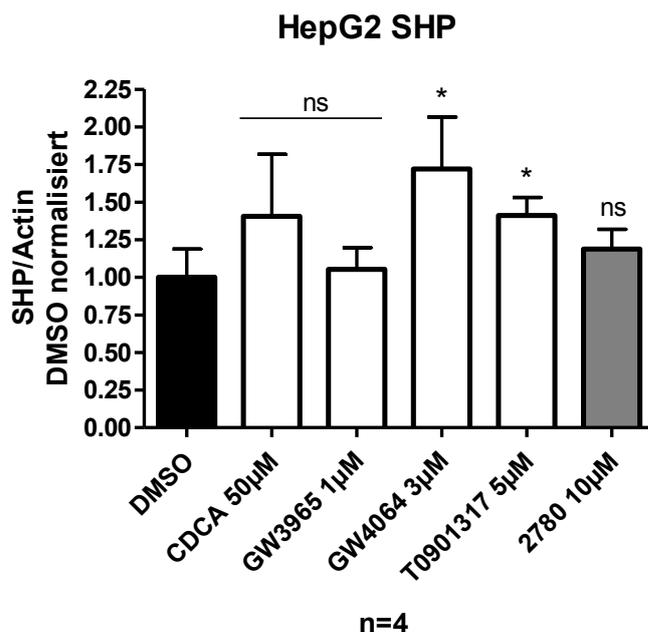


Abbildung 13: SHP Proteinlevel in HepG2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

HepG2 Zellen wurden mit den in der Abbildung genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet und die daraus resultierenden Werte wurden auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 4 Versuchen.

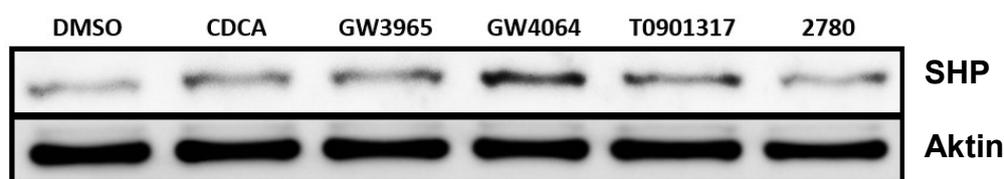


Abbildung 14: Ausschnitt des SHP Proteins/Aktin eines HepG2 Western Blots
Das SHP-Protein wurde wie erwartet bei ~30 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

1.3. SRB1

Die SRB1-Level werden für gewöhnlich durch eine Aktivierung des Farnesoid X Rezeptors hinauf reguliert [240, 241]. Aus diesem Grund erschien die Testung dieses Proteins mit dem FXR-Agonisten 2780 in den HepG2 Zellen sinnvoll, jedoch zeigt sich in Abbildung 15 und 16, dass eine Stimulation der Zellen weder mit den FXR-Agonisten, noch mit den LXR-Agonisten in den entsprechenden

Konzentrationen bei diesen Versuchen zu einer signifikanten Erniedrigung der Proteinlevel von SRB1 geführt hat.

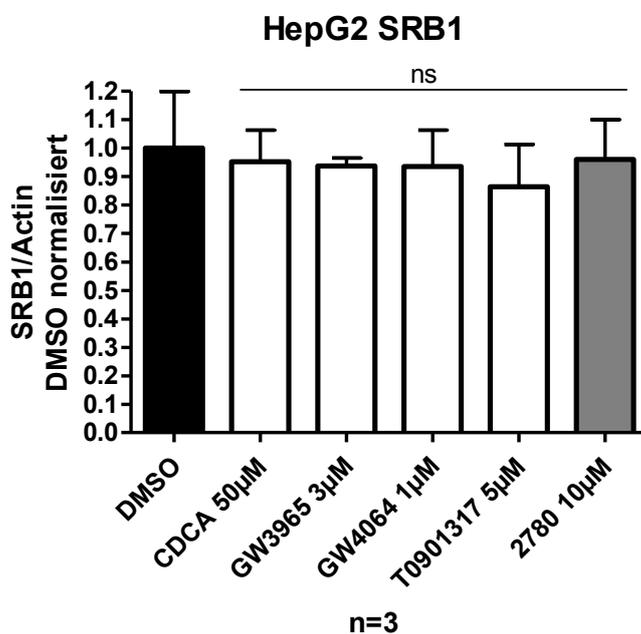


Abbildung 15: SRB1 Proteinlevel in HepG2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

HepG2 Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet und die daraus resultierenden Werte wurden auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 Versuchen.

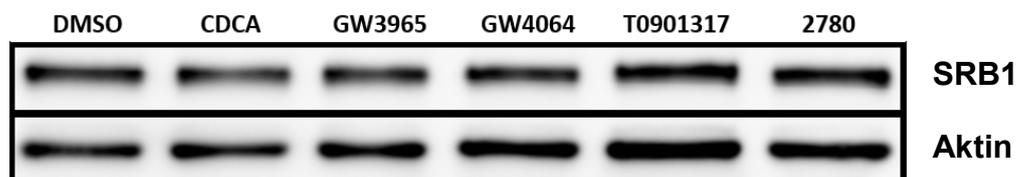


Abbildung 16: Ausschnitt des SRB1 Proteins/Aktin eines HepG2 Western Blots
Das SRB1-Protein wurde wie erwartet bei ~80 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

1.4. ABCG8

ABCG8 wird indirekt über LXR reguliert. So sollte es durch eine Stimulation von LXR zu erhöhten Level von ABCG8 kommen [242]. Im Gegensatz dazu kann es

bei einer Aktivierung von FXR durch seine Agonisten zum einen zu einer LRH-1 medierten Senkung der ABCG8 Niveaus kommen, zum anderen kann es zu einer Erhöhung von ABCG8 führen [242, 243]. Aufgrund des schlechten Ansprechens bei bereits durchgeführten Western Blots mit Caco-2 Proben und der schlechten Detektierbarkeit des Antikörpers, wurde nur ein einziger Immunoblot mit diesem Antikörper gemacht. Das Ergebnis dieses Blots ist in Abbildung 17 und 18 graphisch aufbereitet.

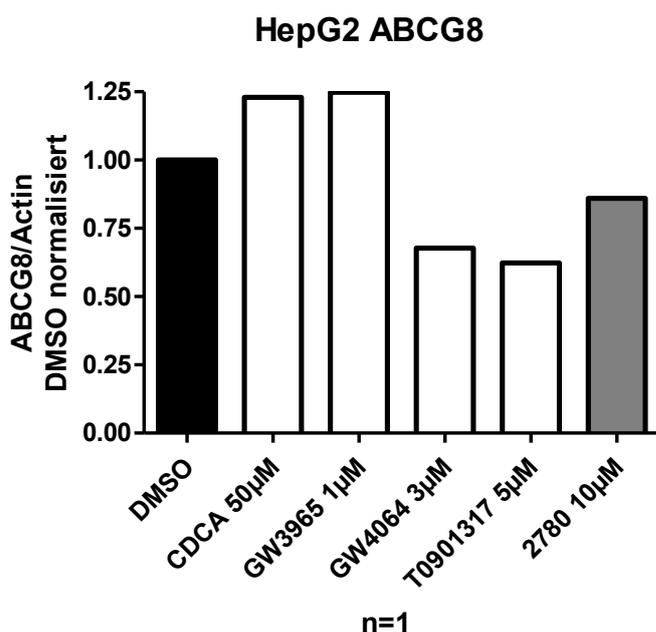


Abbildung 17: ABCG8 Proteinlevel in HepG2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

HepG2 Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurde dieses elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet und die daraus resultierenden Werte wurden auf 0,1 % DMSO normalisiert.

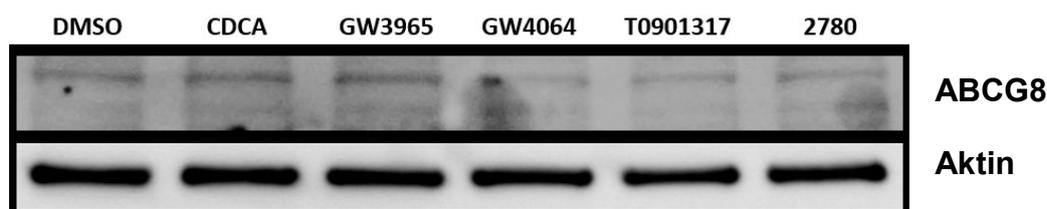


Abbildung 18: Ausschnitt des ABCG8 Proteins/Aktin eines HepG2 Western Blots

Das ABCG8-Protein wurde als Doppelbande bei ~70 kDa und ~85 kDa statt als einzelne Bande bei ~60 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

2. Ergebnisse der Caco-2 Western Blots

Die Caco-2 Zellen wurden als Zellkulturmodell für den Darm verwendet. Da der FXR-Rezeptor vor allem den Lipid- und den Gallensäurestoffwechsel beeinflusst, wurden, um die Auswirkungen der FXR-agonistischen Wirkung des Leoligin-Derivates 2780 auf spezifische Proteine im Darm zu testen, die Cholesterintransporter ABCA1 und NPC1L1, die zur Homöostase des Cholesterin- und Lipidstoffwechsels beitragen [111, 235], und das Protein FGF19, das zwar im Darm synthetisiert wird, jedoch die Gallensäureproduktion in der Leber beeinflusst [141], ausgesucht. Als Testsubstanzen wurden LXR- und FXR-Agonisten ausgewählt, da beide dieser nukleären Rezeptoren bei einer Ligandenbindung stark in jene Stoffwechselkreisläufe eingreifen [176]. Dazu wurden die Zellen einerseits in früheren Experimenten mit DMSO (Negativkontrolle), GW3965, CDCA, GW4064, T0901317, wobei GW3965 und T0901317 die LXR- [186, 187], CDCA und GW4064 die FXR-Agonisten sind [40, 208], und dem Leoligin-Derivat 2780, das von der Arbeitsgruppe Marko Mihovilovic (TU Wien) synthetisiert und bereitgestellt wurde, behandelt. Für den Zeitverlauf andererseits wurden nur DMSO und die beiden FXR-Agonisten GW4064 und CDCA verwendet, um festzustellen, ob der Zeitpunkt der Stimulation einen Einfluss auf die Konzentration von FGF19 hat und ob sich die gewählten FXR-Agonisten als Positivkontrollen für den Nachweis einer FXR-Aktivierung im Western Blot eignen.

2.1. ABCA1

Die Expression des ABCA1-Transporters wird durch die Aktivierung von LXR hochreguliert, wohingegen die FXR-Agonisten gemäß derzeitigem Wissensstand zu keiner Erhöhung von ABCA1 führen sollten [235]. In Abbildung 19 und 20 ist diese deutliche, signifikante Steigerung der ABCA1-Level im Vergleich zu der Negativkontrolle (DMSO) durch die LXR-Agonisten GW3965 und T0901317 erkennbar. Die FXR-Agonisten CDCA (100 μ M) und GW4064 (5 μ M) zeigten erstaunlicherweise ebenfalls einen signifikante Erhöhung der Level im Vergleich zu DMSO, jedoch war deren Anstieg im Gegensatz zu der der LXR-Agonisten sehr gering.

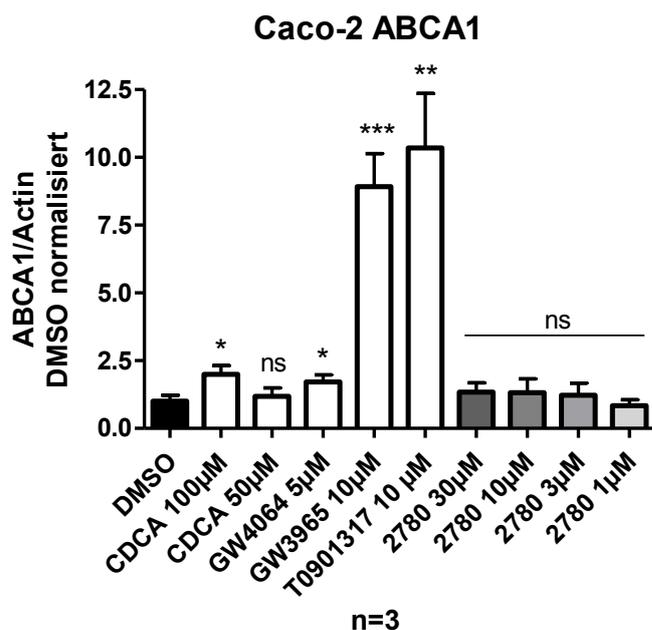


Abbildung 19: : ABCA1 Proteinlevel in Caco-2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

Caco-2 Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet und die daraus resultierenden Werte auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde einerseits ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben und andererseits für CDCA und das Leoglin-Derivat 2780 eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 Versuchen.

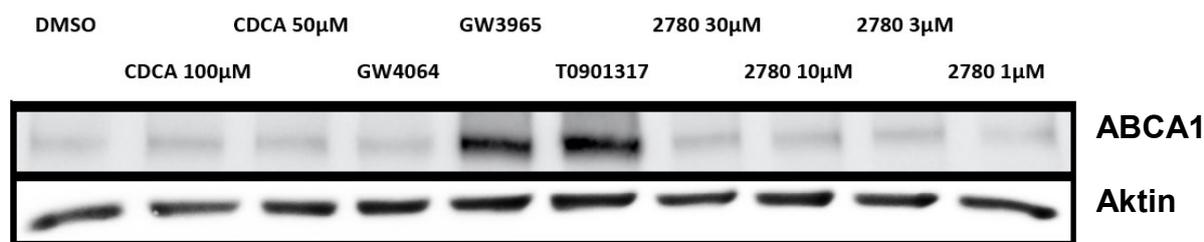


Abbildung 20: Ausschnitt des ABCA1 Proteins/Aktin eines Caco-2 Western Blots
Das ABCA1-Protein wurde bei ~250 kDa statt bei ~220 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

2.2. FGF19

FGF19 ist ein sehr kleines Protein (~21 kDa), das bei einer Stimulation von FXR in den Enterozyten im Darm gebildet wird [141]. Über den Einfluss einer LXR-Aktivierung auf die Produktion von FGF19 ist bisher noch nichts bekannt.

Aufgrund schlechter Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe mit gekochten Ca-co-2 Proben sollte FGF19 zuerst in ungekochten Proben nachgewiesen werden. In Abbildung 21 und 22 ist das Ergebnis dieser Immunoblots dargestellt. So konnte eine signifikante Steigerung durch den FXR-Agonisten GW4064 nachgewiesen werden. Weiters zeigte das Leoligin-Derivat 2780 in den Konzentrationen 1 μ M, 3 μ M und 10 μ M einen signifikanten Anstieg, der sich ebenfalls durch dessen FXR-agonistische Wirkung erklären lässt, jedoch aufgrund seiner im Gegensatz zu GW4064 schwächeren Wirkung etwas abwegig wirkt. Des Weiteren ergab auch der LXR-Agonist GW3965 eine signifikante Erhöhung, obwohl GW3965, soweit bekannt ist, keine FXR-agonistische Wirkung aufweist [186]. Im Gegensatz dazu führte CDCA trotz einer belegten FXR-agonistischen Wirkung zu keiner deutlichen Steigerung von FGF19 im Gegensatz zu DMSO.

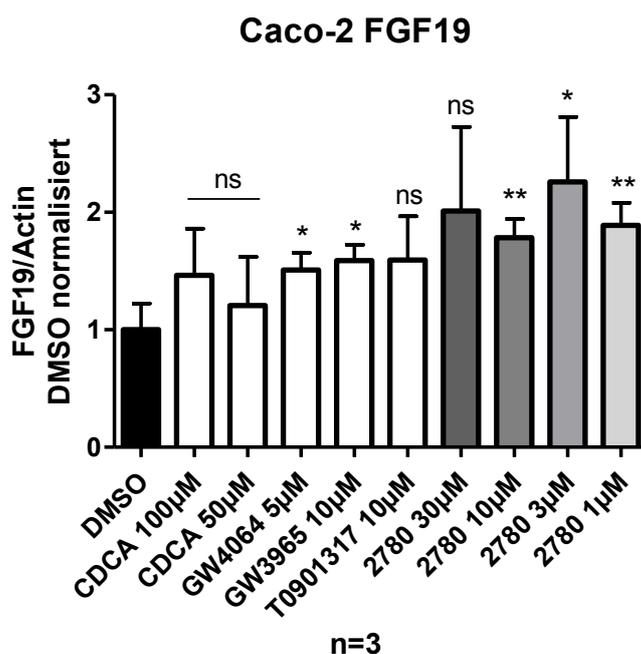


Abbildung 21: FGF19 Proteinlevel in Caco-2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

Caco-2 Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet und die daraus resultierenden Werte auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde einerseits ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben und andererseits für CDCA und das Leoligin-Derivat 2780 eine einfaktorische Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 Versuchen.

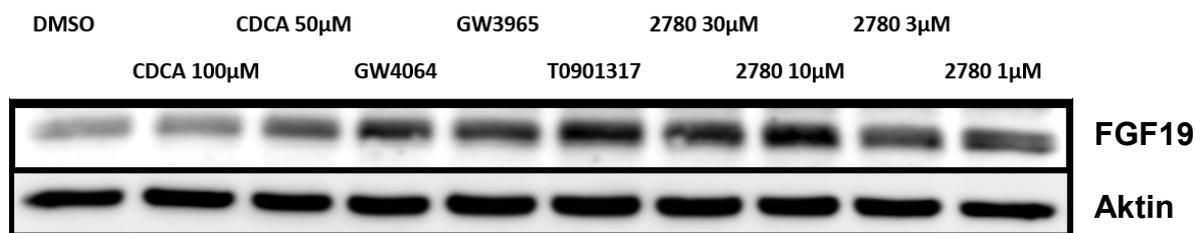


Abbildung 22: Ausschnitt des FGF19 Proteins/Aktin eines Caco-2 Western Blots
 Das FGF19-Protein wurde bei ~30 kDa statt bei ~21 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

Aufgrund des schlechten Ansprechens der FXR Positivkontrollen in den Western Blots der ungekochten Proben und der ein wenig unverhältnismäßig hohen Steigerung durch das Leoligin-Derivat wurden die Blots nun mit gekochten Proben wiederholt, um zu überprüfen, ob diese nun besser ansprechen. Die Ergebnisse jener Blots sind in Abbildung 23 und 24 graphisch aufbereitet. Dabei zeigten die FXR-Positivkontrollen CDCA (50 µM) und GW4064 nun eine signifikante Steigerung. Die Werte von CDCA (100 µM) sind aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Bei dem Leoligin-Derivat 2780 sowie den beiden LXR-Positivkontrollen GW3965 und T0901317 ist ebenfalls keine signifikante Erhöhung nachweisbar, was bei beiden Letzteren jedoch zu Erwarten war.

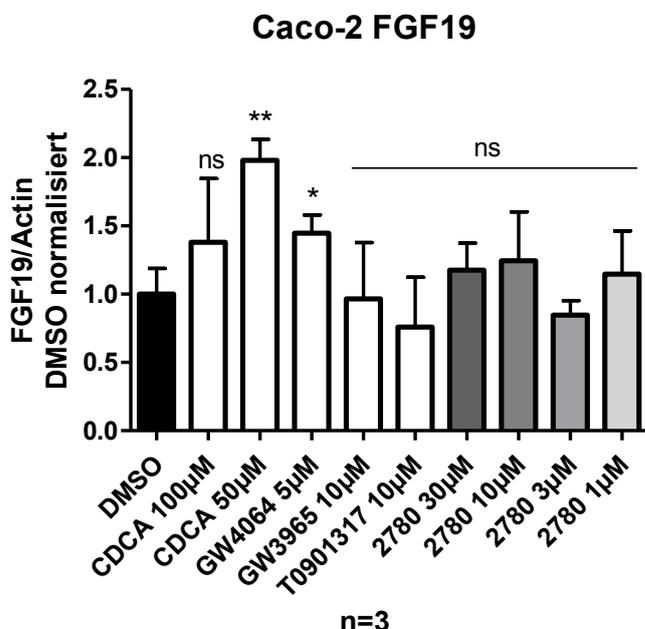


Abbildung 23: FGF19 Proteinlevel in Caco-2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

Caco-2 Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem

entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet und die daraus resultierenden Werte auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde einerseits ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben und andererseits für CDCA und das Leoglin-Derivat 2780 eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 Versuchen.

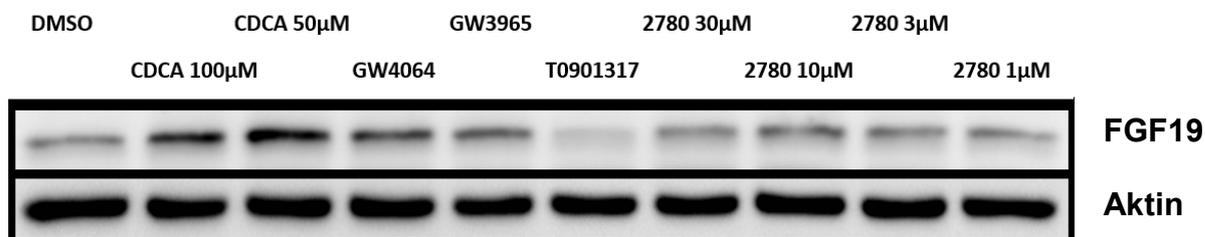


Abbildung 24: Ausschnitt des FGF19 Proteins/Aktin eines Caco-2 Western Blots
Das FGF19-Protein wurde bei ~30 kDa statt bei ~21 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse, dem schlechten Ansprechen der Positivkontrollen für FXR sowie der Tatsache, dass FGF19 von den Darmzellen basolateral sezerniert wird [52, 143], wurde zusätzlich ein Zeitverlauf ausschließlich mit FXR-Positivkontrollen angelegt, um zu testen, ob diese für dieses Experiment überhaupt geeignet sind und/oder ob möglicherweise der Zeitpunkt einen Einfluss auf die Konzentration von FGF19 in den Zelllysaten hat. Nachfolgend sind in Abbildung 25 die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Dabei hat sich gezeigt, dass der Zeitpunkt scheinbar kaum einen Einfluss auf das Vorhandensein von FGF19 in den Proben hat und FGF19 mittels Western Blot nur schlecht nachgewiesen werden kann.

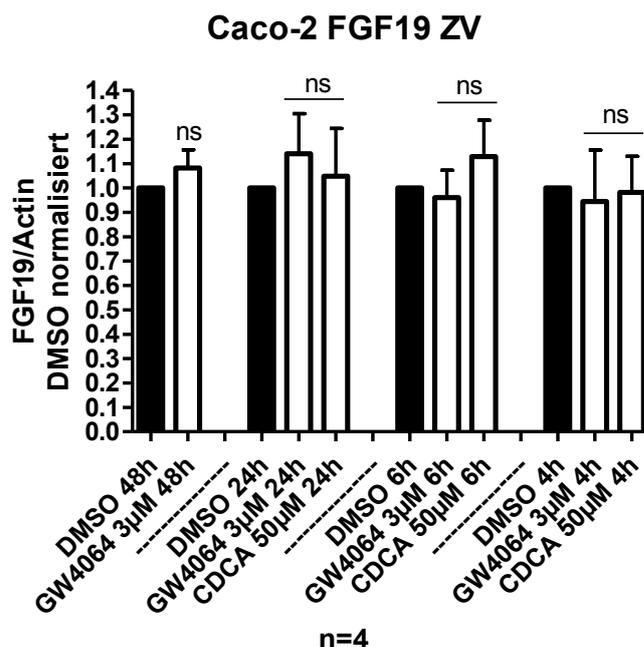


Abbildung 25: FGF19 Proteinlevel in Caco-2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen zu verschiedenen Zeitpunkten

Caco-2 Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h, 24 h, 6 h oder 4 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet und die daraus resultierenden Werte auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 4 Versuchen.

2.3. NPC1L1

Durch LXR-Agonisten wird die Genexpression des Niemann-Pick C1-like Protein 1 für gewöhnlich herabgesetzt [244]. Über die Wirkung von FXR auf NPC1L1 ist momentan noch nichts bekannt, daher ist davon auszugehen, dass FXR Agonisten keinerlei Einfluss auf die Proteinlevel haben sollten. Die Abbildung 26 und 27 zeigt deutlich, dass diese Absenkung der Proteinkonzentration durch die LXR-Agonisten GW3965 und T0901317 nicht nur nicht nachweisbar war, sondern es vielmehr zu einer Erhöhung von NPC1L1 durch alle getesteten Substanzen im Vergleich zu DMSO gekommen war.

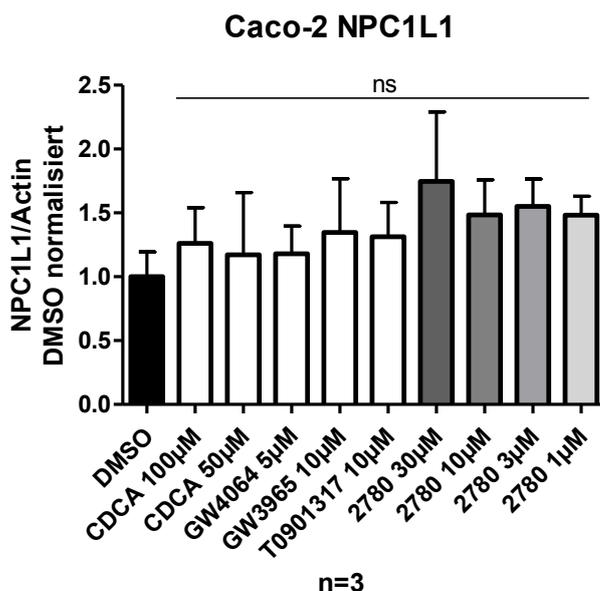


Abbildung 26: NPC1L1 Proteinlevel in Caco-2 Zellen nach Behandlung mit diversen Verbindungen

Caco-2 Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang behandelt. Nach der Lysatherstellung wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen und darauf mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet und die daraus resultierenden Werte auf 0,1 % DMSO normalisiert. Für die Statistik wurde einerseits ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben und andererseits für CDCA und das Leoligin-Derivat 2780 eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewendet. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 Versuchen.

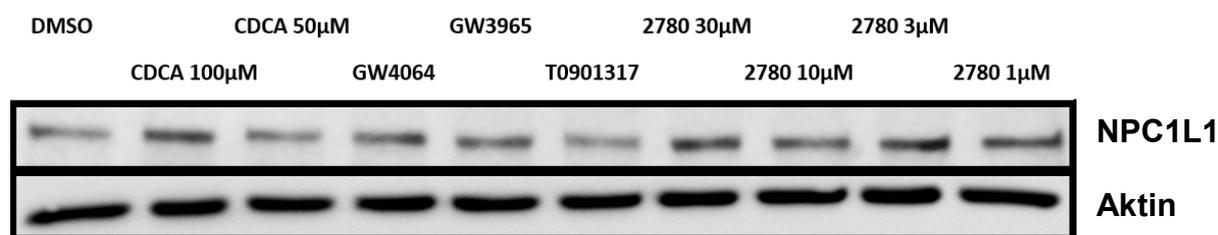


Abbildung 27: Ausschnitt des NPC1L1 Proteins/Aktin eines Caco-2 Western Blots

Das NPC1L1-Protein wurde bei ~160 kDa statt bei ~140 kDa nachgewiesen und ausgewertet.

D. DISKUSSION

Für die Untersuchung des Leoligin-Derivates 2780 hinsichtlich seiner potenziellen Wirkung auf verschiedene Cholesterintransporter und auf die Proteine SHP und FGF19 wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet: So sind HepG2 Zellen und Caco-2 Zellen trotz einiger Unterschiede zu primären Zellen validierte Modelle für Leber und Dünndarm des Menschen [245-247].

Zuallererst sollte aufgrund vorheriger Ergebnisse in THP-1 Makrophagen [248] untersucht werden, ob die Substanz auch in den Leber- und Darmzellen eine Steigerung der Expressionsrate von ABCA1 zur Folge hat: ABCA1 wird für gewöhnlich über den Liver X Rezeptor reguliert [235, 236], weswegen es nicht überaus verwunderlich war, dass auch das Derivat 2780 zu keiner Veränderung der Expression geführt hat.

Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Wirkung von FXR-Agonisten [242, 243] und wegen des schlechten Ansprechens des ABCG8-Antikörpers bei Western Blots mit Caco-2 Zellen innerhalb der Arbeitsgruppe sollte die Auswirkung von FXR- und LXR-Agonisten auf die ABCG8 Expression in Leberzellen untersucht werden: Da jedoch zum einen nur einer der beiden LXR-Agonisten zu einer Erhöhung von ABCG8 geführt hat, obwohl es durch eine Aktivierung des LXR zu einem deutlichen Anstieg kommen sollte [242], und das untersuchte Leoligin-Derivat keine Veränderung der ABCG8-Level bewirkt hat und weil andererseits der Antikörper obendrein erneut schlecht zu detektieren war, wurde nur ein einziger Blot angefertigt.

Als nächstes sollte der Effekt des Leoligin-Derivates 2780 auf das Membranprotein SRB1, das aufgrund seiner Wirkung auf den Lipidstoffwechsel von Interesse ist, untersucht werden: Dabei konnte bei diesen Experimenten weder durch das Derivat, noch durch die FXR-Positivkontrollen eine Erhöhung nachgewiesen werden. Allerdings liegen bereits Ergebnisse vor, die eine Steigerung der SRB1-Level durch CDCA und GW4064 in einem sehr ähnlichen Versuchsaufbau zeigen

konnten, weshalb sich jedoch die Frage stellt, weswegen diese Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten [240].

Daraufhin sollte erforscht werden, ob eine Wirkung der Substanz auf das Protein SHP, das nachweislich über FXR reguliert wird [55], belegt werden kann. So zeigten zwar einerseits der FXR-Agonist GW4064 und der duale FXR/LXR-Agonist T0901317 eine signifikante Erhöhung, andererseits führten CDCA und das Leogigin-Derivat 2780 zu keinem signifikanten Anstieg des Proteins. Dies lässt sich einerseits dadurch erklären, dass GW4064 und T0901317 einen höheren EC_{50} aufweisen [187, 208], andererseits jedoch hemmt CDCA nachgewiesenermaßen die Gallensäuresynthese im Körper über SHP [55], weshalb die Frage offen bleibt, wieso dies nicht nachweisbar war.

Danach wurde überprüft, ob es durch das Derivat 2780 eine Änderung der Expressionsrate von FGF19 kommt, da dessen Produktion und Freisetzung ebenfalls über FXR reguliert wird [141], und ob sich dies im Western Blot nachweisen lässt: Dazu wurden die Immunoblots aufgrund schlechter Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe zuerst mit gekochten Proben durchgeführt, wobei die FXR-Positivkontrollen nur schlecht oder gar nicht darauf angesprochen haben. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit gekochten Proben wiederholt: Dabei haben zwar beide Positivkontrollen von FXR die Expression erhöht, jedoch war weder bei CDCA, noch bei der Substanz eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ersichtlich. Da die Positivkontrollen andererseits in keinem der beiden Experimente eine besonders große Steigerung der FGF19-Level zeigten und da FGF19 nach seiner Bildung basolateral sezerniert wird [52], lag der Schluss nahe, zu versuchen, das Protein im basolateralen Überstand nachzuweisen. Dazu wurde die Flüssigkeit aus den Eppis mit dem apikalen und basolateralen Medium in einer beheizbaren Zentrifuge unter Vakuum abgedampft und der Rückstand anschließend in 60 μ l Lysispuffer aufgenommen und mit 30 μ l 3x Probenpuffer vermischt. Zusätzlich dazu, dass die Elektrophorese aufgrund der sehr hohen verbliebenen Salzkonzentrationen in den Proben nur sehr schlecht funktioniert hat, war FGF19 bei der Auswertung dieser Immunoblots weder in den apikalen, noch in den basolateralen Proben nachweisbar. Da FGF19 in diesem Fall mittels Western Blot nur schlecht nachgewiesen werden konnte, obwohl diese Technik normalerweise

sehr spezifisch und auch sehr empfindlich ist, wäre auch eine Testung mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) oder Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR/rt-PCR), einer Weiterentwicklung der von Kary Mullis und seinem Team erfundenen PCR, denkbar, weil diese sich ebenfalls zum sensitiven, semiquantitativen Nachweis eines Proteins oder dessen DNA eignen [249-251].

Abschließend sollte überdies erforscht werden, ob der FXR-Agonist 2780 die Level an NPC1L1 senken kann. In den Western Blot-Versuchen hat das Leoligin-Derivat jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der Expression des Cholesterin-Transporters geführt. Durch die Positivkontrollen von LXR hätte es zu einer deutlichen Senkung der NPC1L1-Level kommen sollen [244], die sich in diesen Experimenten aber nicht nachweisen ließ. Bei anderen Experimenten, die innerhalb der Arbeitsgruppe mit einem (mit Ausnahme des Lysispuffers) nahezu identen Protokoll durchgeführt wurde, konnte eine Senkung bestätigt werden, weswegen die Vermutung nahe liegt, dass möglicherweise ein anderer Lysispuffer besser geeignet ist, um das Membranprotein NPC1L1 aus dieser herauszulösen, damit es detektiert werden kann.

In dieser Arbeit hat das Leoligin-Derivat 2780, das in der Arbeitsgruppe bereits als FXR-Agonist identifiziert wurde [239], keine signifikante Änderung der Expression von wichtigen Transportern und Proteinen für den Lipid- und Gallensäurehaushalt hervorgerufen. Es ist jedoch bekannt, dass unterschiedliche FXR-Agonisten die Expression verschiedener Target-Gene unterschiedlich stark verändern [252]. Da aber auch die Positivkontrollen von FXR in mehreren Fällen nicht so gut angesprochen haben, ist es möglich, dass vorgegebene Protokoll oder die eingesetzten Substanzen nicht optimal für einen Nachweis der gewünschten Proteine geeignet sind.

E. FAZIT

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, herauszufinden, ob sich eine Änderung der Expressionsraten von verschiedenen Cholesterintransportern und den Proteinen SHP und FGF19, die eine wichtige Rolle im Gallensäurehaushalt spielen, durch das Leoligin-Derivat 2780 aufgrund dessen FXR-agonistischer Wirkung nachweisen lässt. So wurde der Effekt der LXR-Agonisten GW3965 und T0901317, der FXR-Positivkontrollen GW4064 und CDCA sowie der Substanz mittels Western Blot getestet. DMSO wurde dabei als Negativkontrolle eingesetzt, da alle Substanzen darin gelöst wurden. Es konnte jedoch bei diesen Experimenten keine relevante Steigerung oder Abschwächung der Expressionsraten durch das Leoligin-Derivat festgestellt werden.

F. REFERENZEN

1. Robinson-Rechavi, M., H. Escriva Garcia, and V. Laudet, *The nuclear receptor superfamily*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 4): p. 585-6.
2. Adams, M.D., et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2185-95.
3. Robinson-Rechavi, M., et al., *How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?* Trends Genet, 2001. **17**(10): p. 554-6.
4. Robinson-Rechavi, M. and V. Laudet, *Bioinformatics of nuclear receptors*. Methods Enzymol, 2003. **364**: p. 95-118.
5. Sluder, A.E., et al., *The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes*. Genome Res, 1999. **9**(2): p. 103-20.
6. Jensen, E.V., *On the mechanism of estrogen action*. Perspect Biol Med, 1962. **6**: p. 47-59.
7. Green, S., et al., *Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A*. Nature, 1986. **320**(6058): p. 134-9.
8. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
9. Giguere, V., et al., *Functional domains of the human glucocorticoid receptor*. Cell, 1986. **46**(5): p. 645-52.
10. Miesfeld, R., et al., *Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA*. Cell, 1986. **46**(3): p. 389-99.
11. Green, S. and P. Chambon, *Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor*. Nature, 1987. **325**(6099): p. 75-8.
12. Umesono, K. and R.M. Evans, *Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1139-46.
13. Umesono, K., et al., *Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element*. Nature, 1988. **336**(6196): p. 262-5.

14. Giguere, V., et al., *Identification of a new class of steroid hormone receptors*. Nature, 1988. **331**(6151): p. 91-4.
15. Milbrandt, J., *Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene*. Neuron, 1988. **1**(3): p. 183-8.
16. O'Malley, B., *The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future*. Mol Endocrinol, 1990. **4**(3): p. 363-9.
17. Wang, A.M., M.V. Doyle, and D.F. Mark, *Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 9717-21.
18. Gronemeyer, H. and V. Laudet, *Transcription factors 3: nuclear receptors*. Protein Profile, 1995. **2**(11): p. 1173-308.
19. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
20. Whitfield, G.K., et al., *Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function*. J Cell Biochem, 1999. **Suppl 32-33**: p. 110-22.
21. Evans, R.M. and D.J. Mangelsdorf, *Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang*. Cell, 2014. **157**(1): p. 255-66.
22. Kliewer, S.A., B. Goodwin, and T.M. Willson, *The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 687-702.
23. Mangelsdorf, D.J. and R.M. Evans, *The RXR heterodimers and orphan receptors*. Cell, 1995. **83**(6): p. 841-50.
24. Forman, B.M., et al., *Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors*. Cell, 1995. **81**(4): p. 541-50.
25. Kurokawa, R., et al., *Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers*. Genes Dev, 1993. **7**(7B): p. 1423-35.
26. Leblanc, B.P. and H.G. Stunnenberg, *9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1811-6.
27. Peet, D.J., B.A. Janowski, and D.J. Mangelsdorf, *The LXRs: a new class of oxysterol receptors*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(5): p. 571-5.

28. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha*. *Nature*, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
29. Zhao, C. and K. Dahlman-Wright, *Liver X receptor in cholesterol metabolism*. *J Endocrinol*, 2010. **204**(3): p. 233-40.
30. Rader, D.J., *Liver X receptor and farnesoid X receptor as therapeutic targets*. *Am J Cardiol*, 2007. **100**(11 A): p. n15-9.
31. Germain, P., et al., *Overview of nomenclature of nuclear receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(4): p. 685-704.
32. Olefsky, J.M., *Nuclear receptor minireview series*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(40): p. 36863-4.
33. Nuclear Receptors Nomenclature, C., *A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily*. *Cell*, 1999. **97**(2): p. 161-3.
34. Gronemeyer, H., J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(11): p. 950-64.
35. Forman, B.M., et al., *Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites*. *Cell*, 1995. **81**(5): p. 687-93.
36. Seol, W., H.S. Choi, and D.D. Moore, *Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors*. *Mol Endocrinol*, 1995. **9**(1): p. 72-85.
37. Katz, D.H., et al., *A rapid, semi-automated counting procedure for enumeration of antibody-forming cells in gel and nucleated cells in suspension*. *J Immunol Methods*, 1977. **17**(3-4): p. 285-91.
38. Parks, D.J., et al., *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. *Science*, 1999. **284**(5418): p. 1365-8.
39. Wang, H., et al., *Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR*. *Mol Cell*, 1999. **3**(5): p. 543-53.
40. Fiorucci, S., et al., *Targetting farnesoid-X-receptor: from medicinal chemistry to disease treatment*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(2): p. 139-59.
41. Lee, F.Y., et al., *FXR, a multipurpose nuclear receptor*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(10): p. 572-80.
42. Zhang, Y., H.R. Kast-Woelbern, and P.A. Edwards, *Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(1): p. 104-10.

43. Vaquero, J., et al., *Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(7): p. 926-39.
44. Zhang, Y. and P.A. Edwards, *FXR signaling in metabolic disease*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(1): p. 10-8.
45. Claudel, T., B. Staels, and F. Kuipers, *The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2020-30.
46. Ma, K., et al., *Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(4): p. 1102-9.
47. Dufer, M., et al., *The significance of the nuclear farnesoid X receptor (FXR) in beta cell function*. *Islets*, 2012. **4**(5): p. 333-8.
48. Zhang, S., et al., *Suppression of interleukin-6-induced C-reactive protein expression by FXR agonists*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **379**(2): p. 476-9.
49. Massafra, V., et al., *Farnesoid X Receptor Activation Promotes Hepatic Amino Acid Catabolism and Ammonium Clearance in Mice*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(6): p. 1462-1476 e10.
50. Chen, W.D., et al., *Nuclear bile acid receptor FXR in the hepatic regeneration*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(8): p. 888-92.
51. Boyer, J.L., *Bile formation and secretion*. *Compr Physiol*, 2013. **3**(3): p. 1035-78.
52. de Aguiar Vallim, T.Q., E.J. Tarling, and P.A. Edwards, *Pleiotropic roles of bile acids in metabolism*. *Cell Metab*, 2013. **17**(5): p. 657-69.
53. Fisher, M.M. and I.M. Yousef, *Sex differences in the bile acid composition of human bile: studies in patients with and without gallstones*. *Can Med Assoc J*, 1973. **109**(3): p. 190-3.
54. Chiang, J.Y., *Bile acid metabolism and signaling*. *Compr Physiol*, 2013. **3**(3): p. 1191-212.
55. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(10): p. 1955-66.
56. Matsubara, T., F. Li, and F.J. Gonzalez, *FXR signaling in the enterohepatic system*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **368**(1-2): p. 17-29.

57. Wang, T.Y., et al., *New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption*. Eur J Clin Invest, 2013. **43**(11): p. 1203-23.
58. Cortes, V.A., et al., *Physiological and pathological implications of cholesterol*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 416-28.
59. Daniels, T.F., et al., *Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health*. Int J Biol Sci, 2009. **5**(5): p. 474-88.
60. Fiorucci, S., et al., *Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders*. Trends Mol Med, 2007. **13**(7): p. 298-309.
61. Crawley, M.L., *Farnesoid X receptor modulators: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2010. **20**(8): p. 1047-57.
62. Merk, D., D. Steinhilber, and M. Schubert-Zsilavecz, *Medicinal chemistry of farnesoid X receptor ligands: from agonists and antagonists to modulators*. Future Med Chem, 2012. **4**(8): p. 1015-36.
63. Carotti, A., et al., *Beyond bile acids: targeting Farnesoid X Receptor (FXR) with natural and synthetic ligands*. Curr Top Med Chem, 2014. **14**(19): p. 2129-42.
64. Neuschwander-Tetri, B.A., et al., *Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial*. Lancet, 2015. **385**(9972): p. 956-65.
65. Nevens, F., et al., *A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis*. N Engl J Med, 2016. **375**(7): p. 631-43.
66. Fang, S., et al., *Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance*. Nat Med, 2015. **21**(2): p. 159-65.
67. Cui, J., et al., *Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10214-20.
68. Luciani, M.F., et al., *Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9*. Genomics, 1994. **21**(1): p. 150-9.
69. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23742-7.

70. Langmann, T., et al., *Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **257**(1): p. 29-33.
71. Bodzioch, M., et al., *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease*. *Nat Genet*, 1999. **22**(4): p. 347-51.
72. Brooks-Wilson, A., et al., *Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency*. *Nat Genet*, 1999. **22**(4): p. 336-45.
73. Christiansen-Weber, T.A., et al., *Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(3): p. 1017-29.
74. Liao, F., H. Yoon, and J. Kim, *Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease*. *Curr Opin Lipidol*, 2017. **28**(1): p. 60-67.
75. Basso, F., et al., *Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(2): p. 296-302.
76. Sahoo, D., et al., *ABCA1-dependent lipid efflux to apolipoprotein A-I mediates HDL particle formation and decreases VLDL secretion from murine hepatocytes*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(6): p. 1122-31.
77. Timmins, J.M., et al., *Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1333-42.
78. Oku, H., et al., *Adiponectin deficiency suppresses ABCA1 expression and ApoA-I synthesis in the liver*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(26): p. 5029-33.
79. Ghanbari-Niaki, A., et al., *Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **361**(4): p. 841-6.
80. Joyce, C.W., et al., *ABCA1 overexpression in the liver of LDLr-KO mice leads to accumulation of pro-atherogenic lipoproteins and enhanced atherosclerosis*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(44): p. 33053-65.
81. Ma, K.L., et al., *Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice*. *Hepatology*, 2008. **48**(3): p. 770-81.

82. Brunham, L.R., et al., *Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 1052-62.
83. Khabazian, B.M., et al., *Endurance training enhances ABCA1 expression in rat small intestine*. Eur J Appl Physiol, 2009. **107**(3): p. 351-8.
84. Plat, J. and R.P. Mensink, *Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption*. FASEB J, 2002. **16**(10): p. 1248-53.
85. Graf, G.A., et al., *ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48275-82.
86. Wang, J., et al., *Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine*. J Lipid Res, 2015. **56**(2): p. 319-30.
87. Berge, K.E., et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1771-5.
88. Lee, M.H., et al., *Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 79-83.
89. Hubacek, J.A., et al., *Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels*. Physiol Res, 2004. **53**(4): p. 395-401.
90. Gylling, H., et al., *Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity*. J Lipid Res, 2004. **45**(9): p. 1660-5.
91. Gok, O., et al., *ABCG5 and ABCG8 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus in the Turkish population*. Can J Diabetes, 2015. **39**(5): p. 405-10.
92. Szilvasi, A., et al., *Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases*. Genet Test Mol Biomarkers, 2010. **14**(5): p. 667-72.
93. Wu, G., et al., *ABCG5/8 variants are associated with susceptibility to coronary heart disease*. Mol Med Rep, 2014. **9**(6): p. 2512-20.
94. Stender, S., et al., *Sterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G8, gallstones, and biliary cancer in 62,000 individuals from the general population*. Hepatology, 2011. **53**(2): p. 640-8.

95. Yu, L., et al., *Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8742-7.
96. Langheim, S., et al., *ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile*. J Lipid Res, 2005. **46**(8): p. 1732-8.
97. Yu, L., et al., *Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16237-42.
98. Yu, L., et al., *Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 671-80.
99. Brown, J.M. and L. Yu, *Opposing Gatekeepers of Apical Sterol Transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8)*. Immunol Endocr Metab Agents Med Chem, 2009. **9**(1): p. 18-29.
100. Khovidhunkit, W., et al., *Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR*. J Lipid Res, 2003. **44**(9): p. 1728-36.
101. Jiang, Z.Y., et al., *Increased expression of LXR alpha, ABCG5, ABCG8, and SR-BI in the liver from normolipidemic, nonobese Chinese gallstone patients*. J Lipid Res, 2008. **49**(2): p. 464-72.
102. Yu, X.H., et al., *ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis*. Clin Chim Acta, 2014. **428**: p. 82-8.
103. Su, K., et al., *The ABCG5 ABCG8 sterol transporter opposes the development of fatty liver disease and loss of glycemic control independently of phytosterol accumulation*. J Biol Chem, 2012. **287**(34): p. 28564-75.
104. Davies, J.P., B. Levy, and Y.A. Ioannou, *Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1*. Genomics, 2000. **65**(2): p. 137-45.
105. Yu, L., *The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein*. Curr Opin Lipidol, 2008. **19**(3): p. 263-9.
106. Mirshahi, U.L. and D.J. Carey, *Mutations in NPC1L1 and coronary heart disease*. N Engl J Med, 2015. **372**(9): p. 881.

107. Muendlein, A., et al., *Common single nucleotide polymorphisms at the NPC1L1 gene locus significantly predict cardiovascular risk in coronary patients*. *Atherosclerosis*, 2015. **242**(1): p. 340-5.
108. Geach, T., *Coronary heart disease: NPC1L1 mutations lower CHD risk*. *Nat Rev Cardiol*, 2015. **12**(1): p. 3.
109. Lauridsen, B.K., et al., *Genetic variation in the cholesterol transporter NPC1L1, ischaemic vascular disease, and gallstone disease*. *Eur Heart J*, 2015. **36**(25): p. 1601-8.
110. Ray, K., *Hepatitis: NPC1L1 identified as a novel HCV entry factor*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. **9**(3): p. 124.
111. Sane, A.T., et al., *Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(10): p. 2112-20.
112. Yamanashi, Y., T. Takada, and H. Suzuki, *Niemann-Pick C1-like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **320**(2): p. 559-64.
113. Davis, H.R., Jr., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33586-92.
114. Altmann, S.W., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption*. *Science*, 2004. **303**(5661): p. 1201-4.
115. Garcia-Calvo, M., et al., *The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(23): p. 8132-7.
116. Ge, L., et al., *The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1*. *Cell Metab*, 2008. **7**(6): p. 508-19.
117. Valasek, M.A., S.L. Clarke, and J.J. Repa, *Fenofibrate reduces intestinal cholesterol absorption via PPARalpha-dependent modulation of NPC1L1 expression in mouse*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(12): p. 2725-35.
118. Tremblay, A.J., et al., *Atorvastatin increases intestinal expression of NPC1L1 in hyperlipidemic men*. *J Lipid Res*, 2011. **52**(3): p. 558-65.
119. Takada, T., et al., *NPC1L1 is a key regulator of intestinal vitamin K absorption and a modulator of warfarin therapy*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(275): p. 275ra23.

120. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
121. Shen, W.J., et al., *Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions*. Metabolism, 2014. **63**(7): p. 875-86.
122. Cai, S.F., et al., *Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine*. J Lipid Res, 2001. **42**(6): p. 902-9.
123. Levy, E., et al., *Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 2): p. 327-37.
124. Hauser, H., et al., *Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine*. Biochemistry, 1998. **37**(51): p. 17843-50.
125. Reboul, E., et al., *Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4739-45.
126. Altmann, S.W., et al., *The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1580**(1): p. 77-93.
127. Hoekstra, M., T.J. Van Berkel, and M. Van Eck, *Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(47): p. 5916-24.
128. Yuhanna, I.S., et al., *High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 853-7.
129. Hoekstra, M., *SR-BI as target in atherosclerosis and cardiovascular disease - A comprehensive appraisal of the cellular functions of SR-BI in physiology and disease*. Atherosclerosis, 2017. **258**: p. 153-161.
130. Arai, T., et al., *Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2366-71.
131. Rhoads, D. and L. Brissette, *The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 39-77.

132. Ji, Y., et al., *Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33398-402.
133. Out, R., et al., *Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18401-6.
134. Van Eck, M., et al., *Scavenger receptor BI facilitates the metabolism of VLDL lipoproteins in vivo*. J Lipid Res, 2008. **49**(1): p. 136-46.
135. Wiersma, H., et al., *Scavenger receptor BI facilitates hepatic very low density lipoprotein production in mice*. J Lipid Res, 2010. **51**(3): p. 544-53.
136. Rigotti, A., S.L. Acton, and M. Krieger, *The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids*. J Biol Chem, 1995. **270**(27): p. 16221-4.
137. Syder, A.J., et al., *Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors*. J Hepatol, 2011. **54**(1): p. 48-55.
138. Rodrigues, C.D., et al., *Host scavenger receptor SR-BI plays a dual role in the establishment of malaria parasite liver infection*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(3): p. 271-82.
139. Wright, T.J., et al., *Mouse FGF15 is the ortholog of human and chick FGF19, but is not uniquely required for otic induction*. Dev Biol, 2004. **269**(1): p. 264-75.
140. Zhang, J.H., et al., *Potent stimulation of fibroblast growth factor 19 expression in the human ileum by bile acids*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **304**(10): p. G940-8.
141. Holt, J.A., et al., *Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis*. Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1581-91.
142. Lin, B.C., et al., *Liver-specific activities of FGF19 require Klotho beta*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 27277-84.
143. Inagaki, T., et al., *Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis*. Cell Metab, 2005. **2**(4): p. 217-25.
144. Potthoff, M.J., et al., *FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1alpha pathway*. Cell Metab, 2011. **13**(6): p. 729-38.

145. Fu, L., et al., *Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes*. *Endocrinology*, 2004. **145**(6): p. 2594-603.
146. Perry, R.J., et al., *FGF1 and FGF19 reverse diabetes by suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6980.
147. Wu, X. and Y. Li, *Role of FGF19 induced FGFR4 activation in the regulation of glucose homeostasis*. *Aging (Albany NY)*, 2009. **1**(12): p. 1023-7.
148. Morton, G.J., et al., *FGF19 action in the brain induces insulin-independent glucose lowering*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(11): p. 4799-808.
149. Chennamsetty, I., et al., *FGF19 signaling cascade suppresses APOA gene expression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(5): p. 1220-7.
150. Tomlinson, E., et al., *Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity*. *Endocrinology*, 2002. **143**(5): p. 1741-7.
151. Kir, S., et al., *FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1621-4.
152. Kir, S., S.A. Kliewer, and D.J. Mangelsdorf, *Roles of FGF19 in liver metabolism*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011. **76**: p. 139-44.
153. Schaap, F.G., et al., *Prometheus' little helper, a novel role for fibroblast growth factor 15 in compensatory liver growth*. *J Hepatol*, 2013. **59**(5): p. 1121-3.
154. Wu, X., et al., *FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(8): p. 5165-70.
155. Tan, Q., et al., *Identification of FGF19 as a prognostic marker and potential driver gene of lung squamous cell carcinomas in Chinese smoking patients*. *Oncotarget*, 2016. **7**(14): p. 18394-402.
156. Repana, D. and P. Ross, *Targeting FGF19/FGFR4 Pathway: A Novel Therapeutic Strategy for Hepatocellular Carcinoma*. *Diseases*, 2015. **3**(4): p. 294-305.
157. Zhou, M., et al., *Mouse species-specific control of hepatocarcinogenesis and metabolism by FGF19/FGF15*. *J Hepatol*, 2017. **66**(6): p. 1182-1192.

158. Desnoyers, L.R., et al., *Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models*. *Oncogene*, 2008. **27**(1): p. 85-97.
159. Zhang, X., et al., *Increased Expression of FGF19 Contributes to Tumor Progression and Cell Motility of Human Thyroid Cancer*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016. **154**(1): p. 52-8.
160. Degirolamo, C., C. Sabba, and A. Moschetta, *Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23*. *Nat Rev Drug Discov*, 2016. **15**(1): p. 51-69.
161. Lee, Y.S., et al., *Structure and function of the atypical orphan nuclear receptor small heterodimer partner*. *Int Rev Cytol*, 2007. **261**: p. 117-58.
162. Seol, W., H.S. Choi, and D.D. Moore, *An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors*. *Science*, 1996. **272**(5266): p. 1336-9.
163. Masuda, N., et al., *An orphan nuclear receptor lacking a zinc-finger DNA-binding domain: interaction with several nuclear receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1350**(1): p. 27-32.
164. Seol, W., M. Chung, and D.D. Moore, *Novel receptor interaction and repression domains in the orphan receptor SHP*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(12): p. 7126-31.
165. Chanda, D., J.H. Park, and H.S. Choi, *Molecular basis of endocrine regulation by orphan nuclear receptor Small Heterodimer Partner*. *Endocr J*, 2008. **55**(2): p. 253-68.
166. Lee, H.K., et al., *Structure and expression of the orphan nuclear receptor SHP gene*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(23): p. 14398-402.
167. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 517-26.
168. Lu, T.T., et al., *Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 507-15.
169. Watanabe, M., et al., *Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1408-18.

170. Shimamoto, Y., et al., *Inhibitory effect of the small heterodimer partner on hepatocyte nuclear factor-4 mediates bile acid-induced repression of the human angiotensinogen gene*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7770-6.
171. Fiorucci, S., et al., *A farnesoid x receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloprotease expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(2): p. 584-95.
172. Yamagata, K., et al., *Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23158-65.
173. Miao, J., et al., *Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation*. Genes Dev, 2009. **23**(8): p. 986-96.
174. Lee, J.M., et al., *AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32182-91.
175. Kim, Y.D., et al., *Metformin ameliorates IL-6-induced hepatic insulin resistance via induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) in mouse models*. Diabetologia, 2012. **55**(5): p. 1482-94.
176. Edwards, P.A., H.R. Kast, and A.M. Anisfeld, *BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis*. J Lipid Res, 2002. **43**(1): p. 2-12.
177. Salim, A.S., *The permissive role of oxygen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis*. Int J Cancer, 1993. **53**(6): p. 1031-5.
178. Shirley, S.W., B.H. Stewart, and S. Mirelman, *Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders*. Urology, 1978. **11**(3): p. 215-20.
179. Matsumoto, J., *Clinical trials of dimethyl sulfoxide in rheumatoid arthritis patients in Japan*. Ann N Y Acad Sci, 1967. **141**(1): p. 560-8.
180. Haigler, H.J. and D.D. Spring, *DMSO (dimethyl sulfoxide), morphine and analgesia*. Life Sci, 1981. **29**(15): p. 1545-53.

181. Silveira, P.C., et al., *Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle*. *Ultrasound Med Biol*, 2010. **36**(1): p. 44-50.
182. Santos, N.C., et al., *Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **65**(7): p. 1035-41.
183. Da Violante, G., et al., *Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures*. *Biol Pharm Bull*, 2002. **25**(12): p. 1600-3.
184. Brayton, C.F., *Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review*. *Cornell Vet*, 1986. **76**(1): p. 61-90.
185. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
186. Collins, J.L., et al., *Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines*. *J Med Chem*, 2002. **45**(10): p. 1963-6.
187. Houck, K.A., et al., *T0901317 is a dual LXR/FXR agonist*. *Mol Genet Metab*, 2004. **83**(1-2): p. 184-7.
188. Brunham, L.R., et al., *Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels*. *Circ Res*, 2006. **99**(7): p. 672-4.
189. Joseph, S.B., et al., *Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7604-9.
190. Blaschke, F., et al., *Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries*. *Circ Res*, 2004. **95**(12): p. e110-23.
191. Cui, X., et al., *The neurorestorative benefit of GW3965 treatment of stroke in mice*. *Stroke*, 2013. **44**(1): p. 153-61.
192. Laffitte, B.A., et al., *Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5419-24.
193. Joseph, S.B., et al., *Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors*. *Nat Med*, 2003. **9**(2): p. 213-9.

194. Archer, A., et al., *LXR activation by GW3965 alters fat tissue distribution and adipose tissue inflammation in ob/ob female mice*. J Lipid Res, 2013. **54**(5): p. 1300-11.
195. Mitro, N., et al., *T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR*. FEBS Lett, 2007. **581**(9): p. 1721-6.
196. Kanno, Y., et al., *TO901317, a potent LXR agonist, is an inverse agonist of CAR*. J Toxicol Sci, 2013. **38**(3): p. 309-15.
197. Kumar, N., et al., *The benzenesulfoamide T0901317 [N-(2,2,2-trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] is a novel retinoic acid receptor-related orphan receptor-alpha/gamma inverse agonist*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(2): p. 228-36.
198. Gao, M. and D. Liu, *The liver X receptor agonist T0901317 protects mice from high fat diet-induced obesity and insulin resistance*. AAPS J, 2013. **15**(1): p. 258-66.
199. Dai, X.Y., et al., *The effect of T0901317 on ATP-binding cassette transporter A1 and Niemann-Pick type C1 in apoE^{-/-} mice*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **51**(5): p. 467-75.
200. Chisholm, J.W., et al., *The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse*. J Lipid Res, 2003. **44**(11): p. 2039-48.
201. Jakel, H., et al., *The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45462-9.
202. Terasaka, N., et al., *T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. FEBS Lett, 2003. **536**(1-3): p. 6-11.
203. Koldamova, R.P., et al., *The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4079-88.
204. Cheng, Y., et al., *Synthetic liver X receptor agonist T0901317 attenuates high glucose-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in cardiomyocytes*. Acta Histochem, 2014. **116**(1): p. 214-21.

205. Rough, J.J., et al., *Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells*. J Ovarian Res, 2010. **3**: p. 13.
206. Chuu, C.P. and H.P. Lin, *Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22(R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines*. Anticancer Res, 2010. **30**(9): p. 3643-8.
207. Ellis, E., et al., *Feedback regulation of bile acid synthesis in primary human hepatocytes: evidence that CDCA is the strongest inhibitor*. Hepatology, 2003. **38**(4): p. 930-8.
208. Maloney, P.R., et al., *Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR*. J Med Chem, 2000. **43**(16): p. 2971-4.
209. Fromm, H., et al., *[In vivo dissolving of gall-stones: the effect of chenodeoxycholic acid. (author's transl)]*. Dtsch Med Wochenschr, 1975. **100**(32): p. 1619-24.
210. Iser, J.H., et al., *Resistance to chenodeoxycholic acid (CDCA) treatment in obese patients with gall stones*. Br Med J, 1978. **1**(6126): p. 1509-12.
211. Miller, N.E. and P.J. Nestel, *Triglyceride-lowering effect of chenodeoxycholic acid in patients with endogenous hypertriglyceridaemia*. Lancet, 1974. **2**(7886): p. 929-31.
212. Bateson, M.C., et al., *Chenodeoxycholic acid therapy for hypertriglyceridaemia in men*. Br J Clin Pharmacol, 1978. **5**(3): p. 249-54.
213. Ponz de Leon, M., et al., *The effect of chenodeoxycholic acid (CDCA) on cholesterol absorption*. Gastroenterology, 1979. **77**(2): p. 223-30.
214. Calmus, Y., et al., *Immunosuppressive properties of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids in the mouse*. Gastroenterology, 1992. **103**(2): p. 617-21.
215. Calmus, Y., et al., *Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes*. Hepatology, 1992. **16**(3): p. 719-23.
216. Mathai, E., et al., *The effect of bile acids on the growth and adherence of Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther, 1991. **5**(6): p. 653-8.
217. Floch, M.H., et al., *The effect of bile acids on intestinal microflora*. Am J Clin Nutr, 1972. **25**(12): p. 1418-26.

218. Sorg, J.A. and A.L. Sonenshein, *Chenodeoxycholate is an inhibitor of Clostridium difficile spore germination*. J Bacteriol, 2009. **191**(3): p. 1115-7.
219. Van Hattum, J., et al., *Chenodeoxycholic acid therapy in erythrohepatic protoporphyria*. J Hepatol, 1986. **3**(3): p. 407-12.
220. Sirvent, A., et al., *The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 173-7.
221. Liu, Y., et al., *Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1678-87.
222. Yao, J., et al., *FXR agonist GW4064 alleviates endotoxin-induced hepatic inflammation by repressing macrophage activation*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(39): p. 14430-41.
223. Ma, Y., et al., *Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance*. Pharm Res, 2013. **30**(5): p. 1447-57.
224. Singh, N., et al., *Synthetic FXR agonist GW4064 is a modulator of multiple G protein-coupled receptors*. Mol Endocrinol, 2014. **28**(5): p. 659-73.
225. Zhang, S., X. Pan, and H. Jeong, *GW4064, an agonist of farnesoid X receptor, represses CYP3A4 expression in human hepatocytes by inducing small heterodimer partner expression*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(5): p. 743-8.
226. Inagaki, T., et al., *Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3920-5.
227. Dai, J., et al., *Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 41.
228. Dweck, A., *A review of Edelweiss*. SOFW JOURNAL, 2004. **130**(9): p. 65-71.
229. Dobner, M.J., et al., *Antibacterial activity of Leontopodium alpinum (Edelweiss)*. J Ethnopharmacol, 2003. **89**(2-3): p. 301-3.
230. Duwensee, K., et al., *Leoligin, the major lignan from Edelweiss, activates cholesteryl ester transfer protein*. Atherosclerosis, 2011. **219**(1): p. 109-15.

231. Reisinger, U., et al., *Leoligin, the major lignan from Edelweiss, inhibits intimal hyperplasia of venous bypass grafts*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(3): p. 542-9.
232. Schwaiger, S., et al., *New constituents of Leontopodium alpinum and their in vitro leukotriene biosynthesis inhibitory activity*. Planta Med, 2004. **70**(10): p. 978-85.
233. Wang, L., et al., *Leoligin, the Major Lignan from Edelweiss (Leontopodium nivale subsp. alpinum), Promotes Cholesterol Efflux from THP-1 Macrophages*. J Nat Prod, 2016. **79**(6): p. 1651-7.
234. Scharinger, B., et al., *Leoligin, the major lignan from Edelweiss, inhibits 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and reduces cholesterol levels in ApoE-/- mice*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **99**: p. 35-46.
235. Schmitz, G. and T. Langmann, *Structure, function and regulation of the ABC1 gene product*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 129-40.
236. Repa, J.J., et al., *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1524-9.
237. Mencarelli, A., et al., *Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(2): p. H272-81.
238. de Aguiar Vallim, T.Q., et al., *MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor*. Circ Res, 2013. **112**(12): p. 1602-12.
239. Holzer, A., *Naturstoffe und deren Derivate als Modulatoren des Farnesoid X Rezeptors*, in *Pharmazie (Pharmakognosie)*. 2016, Universität Wien. p. 106.
240. Chao, F., et al., *Upregulation of scavenger receptor class B type I expression by activation of FXR in hepatocyte*. Atherosclerosis, 2010. **213**(2): p. 443-8.
241. Lambert, G., et al., *The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2563-70.
242. Repa, J.J., et al., *Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18793-800.

243. Freeman, L.A., et al., *The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter*. J Lipid Res, 2004. **45**(7): p. 1197-206.
244. Duval, C., et al., *Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(4): p. 1259-63.
245. Weaver, R.J., et al., *Test systems in drug discovery for hazard identification and risk assessment of human drug-induced liver injury*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017. **13**(7): p. 767-782.
246. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 27-43.
247. Sun, H., et al., *The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(4): p. 395-411.
248. Kovářová, L., *Characterization of a synthetic leogigin derivative, with agonistic FXR and enhancing macrophage cholesterol efflux activity, in Pharmazie (Pharmakognosie)*. 2016, Univerzita Karlova/Universität Wien. p. 83.
249. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-8.
250. Aydin, S., *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*. Peptides, 2015. **72**: p. 4-15.
251. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
252. Porez, G., et al., *Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 1723-37.

G. ABKÜRZUNGEN

	Englisch	Deutsch
6-ECDCA	6-ethyl chenodeoxycholic acid	6-Ethyl-CDCA
ABC	ATP binding cassette transporter	„ATP binding cassette“-Transporter
AG	antigene	Antigen
AK	antibody	Antikörper
ALT	alanine transaminase	Alanin-Aminotransferase
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammonium persulfate	Ammoniumperoxodisulfat
AST	aspartate transaminase	Aspartat-Aminotransferase
BAR	bile acid receptor	Gallensäurenrezeptor
BMI	body mass index	„Body Mass Index“
BSEP	bile salt export pump	Gallensalzexportpumpe
CA	cholic acid	Cholsäure
CAR	constitutive androstane receptor	„Constitutive Androstan Rezeptors“
CDCA	chenodeoxycholic acid	Chenodesoxycholsäure
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CETP	cholesteryl ester transfer protein	Cholesterinester-Transferprotein
CREB	cAMP response element-binding protein	„cAMP response element-binding protein“
CRP	C-reactive protein	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrome P450	Cytochrom P450
DBD	DNA binding domain	DNA-Bindungsdomäne
DCA	deoxycholic acid	Desoxycholsäure
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced chemiluminescence	„verstärkte“ Chemilumineszenz
EcR	ecdysone receptor	Ecdysteron Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
ER	estrogen receptor	Estrogen Rezeptor
FFS	free fatty acids	freie Fettsäuren
FGF19	fibroblast growth factor 19	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 19
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	FGF-Rezeptor 4
FXR α/β	farnesoid X receptor α/β	Farnesoid X Rezeptor α/β
HDL	high density lipoprotein	Lipoprotein hoher Dichte
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 alpha	„Hepatocyte nuclear factor 4 alpha“

HRP	Horseradish peroxidase	Meerrettichperoxidase
IDL	intermediate density lipoprotein	Lipoprotein mittlerer Dichte
IL-6	interleukin 6	Interleukin-6
LA	lithocholic acid	Lithocholsäure
LBD	ligand binding domain	Ligandenbindungsdomäne
LDH	lactate dehydrogenase	Lactat-Dehydrogenase
LDL	low density lipoprotein	Lipoprotein niederer Dichte
LPL	lipoprotein lipase	Lipoproteinlipase
LRH-1	liver receptor homolog-1	Leber-Rezeptor homolog-1
LXR α/β	liver X receptor α/β	Leber X Rezeptor α/β
MDR2	Multidrug resistance protein 2	Multidrug-Resistance-Protein 2
miRNA	microRNA	MicroRNA
mRNA	messenger ribonucleic acid	Boten-Ribonukleinsäure
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	non-alcoholic steatohepatitis	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NPC1L1	Niemann Pick C1-like protein 1	Niemann Pick C1-like Protein 1
OATP	organic anion-transporting polypeptide	Organo-Anion-Transporter
PBC	primary biliary cirrhosis	primäre biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor
PXR	pregnane X receptor	Pregnan X Rezeptor
RAR	retinoic acid receptor	Retinsäurenrezeptor
ROR α/γ	RAR-related orphan receptor α/γ	RAR-verwandter Waise Rezeptor α/γ
rt-PCR	real time polymerase chain reaction	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	retinoid X receptor	Retinoid X Rezeptor
SDS	sodium dodecyl sulfate	Natriumdodecylsulfat
SHP	small heterodimer partner	„Small heterodimer partner“
SRB1	scavenger-Rezeptor B1	HDL-Rezeptor (Scavenger-Rezeptor B1)
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein-1c	„sterol regulatory element-binding protein-1c“
TBS-T	Tris buffered saline Tween-20	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	tumor necrosis factor alpha	Tumornekrosefaktor- α
UDCA	ursodeoxycholic acid	Ursodesoxycholsäure
USP	ultraspiracle protein	Ultraspiracle Protein
VLDL	very low density lipoprotein	Lipoprotein mit sehr niedriger Dichte