

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Zur Bedeutung von Proteinkinasen und Phosphatidylinositol-
Kinasen für (anti-) cholestatische und (anti-) apoptotische Effekte
von Gallensäuren in der Leberzelle**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Simon Daniel H o h e n e s t e r
aus
München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Beuers

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Adelbert Roscher

Mitberichtersteller: PD Dr. Stefan Holdenrieder

PD Dr. Dorit Nägler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2009

Meinen lieben Eltern.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Grundlagen	1
1.1.1	Chronische cholestatische Leberkrankheiten und experimentelle Cholestase	1
1.1.1.1	Pathophysiologie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten	2
1.1.1.2	Das Modell Tauroolithocholsäure (TLCA)-induzierter Cholestase in der isoliert perfundierten Rattenleber	5
1.1.1.3	Hepatobiliäre Transportmechanismen und deren Regulation bei Cholestase	9
1.1.2	Therapie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten und experimenteller Cholestase	11
1.1.2.1	Wirkmechanismen der UDCA bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten	13
1.1.2.2	Anticholestatische Wirkung von TUDCA im Cholestasemodell	16
1.1.2.3	Vermittlung von TUDCA-Signalen in der gesunden und cholestatischen Leber	18
1.1.3	Phosphatidylinositol-3-Kinasen: Mediatoren von Gallensäureeffekten	20
1.1.3.1	Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen)	20
1.1.3.2	Bedeutung der Klasse I PI3-Kinasen in der Signalgebung von Gallensäuren	22
1.2	Fragestellungen der Arbeit	25
1.2.1	Beeinflussen Gallensäuren den Einbau von Transportproteinen in die apikale Membran von HepG2-Zellen?	25
1.2.2	Vermitteln Isoformen der Proteinkinase C (PKC) und A (PKA) den anticholestatischen Effekt der TUDCA in Leberzellen?	25
1.2.2.1	Bedeutung von cPKC α und PKA für den anticholestatischen Effekt der TUDCA in der isoliert perfundierten Rattenleber	26
1.2.2.2	Bedeutung von cPKC α und PKA für den anticholestatischen Effekt der TCA in der isoliert perfundierten Rattenleber	26
1.2.2.3	Phosphorylierung der Konjugatexportpumpe MRP2 <i>in vitro</i> durch von Gallensäuren aktivierte Proteinkinasen	27

1.2.3	Haben Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) eine Bedeutung für den anticholestatischen Effekt der TUDCA in der isoliert perfundierten Rattenleber?	27
1.2.4	Vermitteln Gallensäuren Ihre biologischen Effekte durch selektive Aktivierung von Isoformen der PI3-Kinase?	28
1.2.4.1	Aktivierung von Isoformen der PI3-Kinase durch Gallensäuren	28
1.2.4.2	Bedeutung der PI3K-Isoform p110 γ für Gallensäuren-induzierte Apoptose	28
2	METHODIK	30
2.1	Modell der isoliert perfundierten Rattenleber	30
2.1.1	Technik der isolierten Rattenleberperfusion	30
2.1.2	Biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP	33
2.1.3	Aktivität der LDH im hepatovenösen Effluat	34
2.1.4	Versuchsprotokolle	36
2.1.4.1	Versuchsprotokoll I für PKC/PKA-Versuchsreihe	36
2.1.4.2	Versuchsprotokoll II für MAPK-Versuchsreihe	37
2.1.5	Molekular- und zellbiologische Untersuchungen im Lebergewebe	39
2.1.5.1	Bestimmung von cAMP per Enzymimmunoassay (EIA)	39
2.1.5.2	Nachweis von P-CREB im Western Blot	40
2.2	<i>In vitro</i> Bestimmung der cPKCα-, nPKCϵ- und PKA-Aktivität	41
2.3	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von MRP2	42
2.3.1	Immunpräzipitation von MRP2 aus HepG2-Zellen	43
2.3.2	Phosphorylierung von MRP2 durch cPKC α , nPKC ϵ und PKA	44
2.4	Modell primärer Rattenhepatozyten	44
2.4.1	Gewinnung und Kultivierung der Zellen	44
2.4.2	Erstellung einer Phospho-PKB Zeitkurve	45
2.4.3	Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der PKB	46
2.4.4	PI3-Kinase-Assay	47

2.5	Modell der Ntcp-transfizierten HepG2-Zelle	49
2.5.1	Kultivierung der Zellen	49
2.5.2	Stabile Transfektion mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt	50
2.5.3	Bestimmung der [³ H]-Taurocholsäure-Aufnahme	51
2.5.4	Untersuchungen zur Bedeutung der PI3-Kinase-Isoform p110 γ für Gallensäuren-induzierte Apoptose	52
2.5.4.1	Caspase 3/7 Aktivität als Maß der Gallensäuren-induzierten Apoptose	52
2.5.4.2	Morphologische Evaluierung der Apoptoserate	54
2.5.4.3	Transiente Transfektion mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ	55
2.5.5	Biotinylierung von Membranproteinen als Indikator für das Maß der Membraninsertion	55
2.6	Materialien	59
2.6.1	Labor Prof. Dr. Beuers, LMU München	59
2.6.2	Labor Prof. Dr. Anwer, Tufts University Boston	60
2.7	Tiere	60
2.8	Statistik	61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	Untersuchungen zur Abhängigkeit der anticholestatischen Wirkung der TUDCA von PKC-Isoformen und PKA	62
3.1.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Wirksamkeit der verwendeten Inhibitoren	62
3.1.2	Bedeutung von PKC und PKA für die anticholestatische Wirkung von TUDCA bei TLCA-induzierter Cholestase	62
3.1.2.1	Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion unter Kontrollbedingungen	63
3.1.2.2	Effekt der PKC-/PKA-Inhibition auf Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion unter Basalbedingungen	65
3.1.2.3	Effekt von PKC-/PKA-Inhibitoren auf die anticholestatische Wirkung der TUDCA	67
3.1.2.4	Effekt von PKC-/PKA-Inhibitoren auf die anticholestatische Wirkung der TCA	77

3.1.2.5	Einfluss von Gallensäuren und Enzyminhibitoren auf die hepatovenöse LDH-Freisetzung	79
3.1.2.6	Einfluss von Gallensäuren und Enzyminhibitoren auf die PKA-Aktivität	81
3.1.3	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von MRP2 durch cPKC α , nPKC ϵ und PKA	83
3.1.4	Dichte des Transportproteins MRP2 in der Membran von HepG2-Zellen	84
3.1.4.1	Apikale Transporterdichte nach Stimulation mit Gallensäuren oder cAMP	84
3.1.4.2	Grenzen des Modells	86
3.2	Bedeutung von MAPK für die anticholestatische Wirkung von TUDCA bei TLCA-induzierter Cholestase	86
3.2.1	Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion unter Kontrollbedingungen	86
3.2.2	Effekt der aktiven MAPK-Inhibitoren unter DMSO und TLCA	90
3.2.3	Effekt der MAPK-Inhibitoren auf die anticholestatische und choleretische Wirkung der TUDCA	92
3.2.3.1	Effekt des p38 ^{MAPK} -Inhibitors SB 202 190	92
3.2.3.2	Effekt des MAPKK -Inhibitors PD 98 059	94
3.2.3.3	Effekt der Koadministration von PD 98 059 und SB 202 190	96
3.2.4	Einfluss von Gallensäuren und MAPK-Inhibitoren auf die hepatovenöse LDH-Freisetzung	98
3.3	Aktivierung von PI3-Kinase-Isoformen durch Gallensäuren	100
3.3.1	PKB-Phosphorylierung als Maß der PI3-Kinase-Gesamtaktivität	100
3.3.2	Aktivierung der PI3-Kinase-Isoformen p110 α , β und γ durch Gallensäuren	101
3.3.3	Bedeutung der PI3-Kinase-Isoform p110 γ für Gallensäure-induzierte Apoptose	104
3.3.3.1	Effekt eines PI3-Kinase p110 γ Inhibitors auf Gallensäure-induzierte Apoptose	104
3.3.3.2	Effekt der Transfektion von HepG2-Zellen mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ auf Gallensäure-induzierte Apoptose	107

4.	DISKUSSION	109
4.1	Signalmediatoren der anticholestatischen Wirkung der TUDCA	110
4.2	Bedeutung von PI3-Kinase-Isoformen für Gallensäuren-induzierte Modulation von Zellsekretion und Zelltod	118
5.	ZUSAMMENFASSUNG	122
6.	LITERATURVERZEICHNIS	124
7.	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	137
8.	LEBENS LAUF	140
9.	DANKSAGUNG	141

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen

1.1.1 Chronische cholestatische Leberkrankheiten und experimentelle Cholestase

Der Begriff Cholestase bezeichnet eine Funktionsstörung der Leber, unter der die Gallenbildung und/oder der Gallenfluss beeinträchtigt sind. Sie resultiert in einer inadäquaten Ausscheidung gallenpflichtiger Substanzen in die Galle und in einem Anstieg der Gewebe- und Plasmaspiegel z.B. von Gallensäuren und Bilirubin. Höhergradige Cholestase führt zu einer Schädigung der Leber und zu einem Mangel von für die Verdauung wichtigen Gallenbestandteilen im Intestinum.^{1,2}

Eine Cholestase wird häufig durch mechanische Ursachen einer Gallenabflussstörung ausgelöst, wie bei einer Choledocholithiasis oder bei Vorliegen eines Pankreaskopftumors der Fall. Darüber hinaus wird sie bei einer Reihe von infektiösen, toxischen, hereditär-metabolischen und autoimmunen Erkrankungen der Leber beobachtet und kann bei genetisch bedingten Sekretionsstörungen der Leberzellen wie z.B. bei der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase oder der benignen rekurrenden intrahepatischen Cholestase (BRIC) transient auftreten.

Sie ist aber auch das Kennzeichen einer Reihe von Krankheitsbildern, die von einer dauerhaften Funktionsstörung der Leber geprägt sind und so als chronische cholestatische Leberkrankheiten bezeichnet werden. Im Kindesalter zählen zu dieser Krankheitsgruppe die zystische Fibrose (CF), die progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC), das Alagille-Syndrom sowie die Gallengangsatresie. Beim Erwachsenen stellen die Primär Biliäre Zirrhose (PBC) und die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) die häufigsten chronischen cholestatischen Leberkrankheiten dar.^{1,2}

Bei PBC wie PSC wird eine laborchemische Erhöhung der so genannten „Cholestaseparameter“, wie der alkalischen Phosphatase (aP), der Gammaglutamyltranspeptidase (GGT) und im Spätstadium des Bilirubins,

beobachtet. Beide Krankheiten verlaufen chronisch progredient über zwölf bis 20 Jahre unter Entwicklung einer Fibrose bzw. Zirrhose der Leber, sodass in der Endphase der Krankheiten eine Lebertransplantation notwendig werden kann³.

Die **Primär Biliäre Zirrhose** stellt die häufigste chronische cholestatische Leberkrankheit des Erwachsenen dar^{4, 5}. Sie betrifft in mehr als 90% der Fälle Frauen mit einem Altersgipfel zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr⁶. Histologisch ist die PBC durch eine Entzündung und Fibrose vornehmlich der kleinen septalen und intralobulären Gallengänge charakterisiert, wobei die Genese dieser Veränderungen noch weitgehend unklar ist. In aktuellen epidemiologischen Untersuchungen wurde für die PBC eine Prävalenz von beinahe 1/1000 Frauen ermittelt⁴.

Die **Primär Sklerosierende Cholangitis** ist nach der PBC die zweithäufigste chronische cholestatische Leberkrankheit des Erwachsenen⁷. Betroffen sind mit 70% der Patienten überwiegend junge Männer im Alter zwischen 25 und 40 Jahren bei Diagnosestellung. Die PSC ist von einer chronischen, fibrosierenden Entzündung der großen intra- und extrahepatischen Gallenwege geprägt und führt zu charakteristischen Stenosierungen und Dilatationen derselben, wobei auch hier die genaue Ätiologie weitgehend unverstanden ist. Die Prävalenz wird auf dem Boden aktueller epidemiologischer Untersuchungen auf bis zu 14/100.000 Einwohner geschätzt⁸. Bei über 70% der PSC-Patienten liegt gleichzeitig eine chronisch entzündliche Darmerkrankung vor, meist eine Colitis ulcerosa, seltener ein Morbus Crohn. Neben der Entwicklung einer Leberzirrhose ist die Entstehung eines cholangiozellulären Karzinoms in acht bis 13 Prozent der Fälle eine bedeutende Spätkomplikation der PSC.

1.1.1.1 Pathophysiologie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten

Die molekularen Mechanismen, die zur Entzündung der Gallenwege und Fibrose bzw. Zirrhose der Leber bei der PBC sowie der PSC führen, sind bis heute nur teilweise verstanden und werden kontrovers diskutiert. Im Folgenden sollen zwei der bekannten Mechanismen der Krankheitsentstehung diskutiert werden: Zum einen die

Akkumulation potentiell toxischer Gallensäuren in Galle und Hepatozyten, welche die Entstehung einer Cholestase zu begünstigen scheinen⁹; zum anderen eine die Krankheitsentstehung fördernde immunologische Fehlregulation auf dem Boden infektiöser oder prädisponierender genetischer Faktoren^{10, 11}.

So erfüllt die **Primär Biliäre Zirrhose (PBC)** Kriterien einer Autoimmunkrankheit. Das Auftreten von antimitochondrialen Autoantikörpern (AMA), die gegen die E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PDC-E2) und verwandter Dehydrogenasen gerichtet sind (AMA-M2), wird bei mehr als 95% der Patienten mit PBC beobachtet und gilt als wesentliches diagnostisches Kriterium. Molekulares Mimikry und chemische PDC-E2-Modifikation durch reagible Umweltstoffe werden als mögliche Ursachen des Toleranzverlustes gegenüber körpereigenem PDC-E2 und damit auch der AMA-Bildung erwogen¹². So wurde der ubiquitär vorkommende gramnegative Organismus *Novosphingobium aromaticivorans*, der Proteine mit hoher Homologie zu PDC-E2 exprimiert, als Kandidat für die Induktion einer die PBC auslösenden Immunreaktion diskutiert. Seren von anti-PDC-E2-positiven PBC Patienten, aber keine Kontrollseren reagierten gegen Proteine von *Novosphingobium aromaticivorans* weit stärker als gegen Proteine von Kontrollkeimen¹³. Die Beobachtung, dass Austausch von Liponsäure im immunogenen Bereich von PDC-E2 durch den strukturell sehr ähnlichen Duftstoff Nonylnonsäure – Ingredienz von Damenparfums mit Veilchen-artigem Aroma - die Immunreaktivität von PBC-Seren *in vitro* erhöht, stützt die Hypothese, dass Umwelteinflüsse für den für die PBC charakteristischen Immuntoleranzverlust gegenüber PDC-E2 eine wichtige Rolle spielen^{12, 14}. Der immunhistochemische Nachweis von PDC-E2-spezifischen CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten im Blut und in den Portalfeldern von PBC-Patienten weist daneben auf eine zellvermittelte Immunreaktion in der Pathogenese der PBC hin. Die häufige Assoziation der PBC mit anderen Autoimmunsyndromen wie dem Sicca-Syndrom oder der Hashimoto-Thyreoditis unterstützt darüber hinaus die Hypothese der PBC als Autoimmunkrankheit.¹⁰

Auch für die **Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)** wird eine autoimmune Komponente in der Pathogenese angenommen, wenn auch die auslösenden Faktoren der Immunreaktion weiter unklar sind. Der Nachweis von atypischen perinukleären Anti-Neutrophilen Cytoplasmatischen Autoantikörpern (atypische

pANCA) gelingt in bis zu 94% der Erkrankten¹⁵⁻¹⁷ ist jedoch nicht spezifisch für die PSC, atypische pANCA werden auch bei Colitis ulcerosa und seltener Morbus Crohn beobachtet. Erhöhte Serumspiegel von Immunglobulin (Ig) G bei einem Drittel der Patienten sowie von IgM in bis zu 50% der Patienten¹⁸ weisen auf ein bisher nicht ausreichend verstandenes immunologisches Geschehen hin. Zeichen einer autoimmunologischen Komponente in der Pathogenese sind die Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Diabetes mellitus, den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, autoimmunen Thyreopathien oder der Rheumatoiden Arthritis^{16, 17} und die Assoziation mit HLA Haplotypen, darunter HLA-B8 und HLA-DR3^{19, 20}.

Neben diesen immunologischen Faktoren wird die Akkumulation potentiell toxischer Gallensäuren in Galle und Hepatozyten als entscheidender Faktor für die Entstehung der Cholestase diskutiert. So rufen hydrophobe Gallensäuren wie Chenodeoxycholsäure (CDCA), Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) im Tiermodell eine hepatozelluläre Cholestase und Leberschädigung hervor^{9, 21-23} und verstärken vorbestehende Gallengangsschäden²⁴. Untersuchungen in einem Rattenmodell zeigten, dass das Ausmaß dieser Schädigung direkt mit den hepatischen Konzentrationen von CDCA und DCA korreliert.²

Erstmals angeregt von Carey *et al.*²⁵ wird eine hepatische Retention von hydrophoben Gallensäuren daher seit 1966 als wesentliche Ursache für die progrediente Leberschädigung bei chronischen cholestatischen Krankheiten auch beim Menschen diskutiert. So konnte die genannte Korrelation der hepatischen Spiegel von CDCA und DCA mit dem Ausmaß der Leberschädigung nicht nur in Tiermodellen^{26, 27}, sondern auch beim Menschen gezeigt werden²⁸.

Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer Gallensäuren-induzierten Cholestase führen, sind dabei wiederum in vielen Aspekten ungeklärt, obwohl in den vergangenen Jahren große Fortschritte im Verständnis der zu Grunde liegenden Pathophysiologie gemacht wurden²⁹⁻³¹ (s. **Kap. 1.1.1.2 und 1.1.2.3**).³²

Die molekularen Mechanismen einer direkten Zellschädigung durch Gallensäuren sind nur zum Teil verstanden. Millimolare Spiegel hydrophober Gallensäuren in der Galle, wie sie bei Gesunden wie auch Patienten mit Cholestase beobachtet werden, wirken möglicherweise bei Patienten mit immunvermittelter

Gallengangsepithelschädigung zusätzlich zytotoxisch und könnten die Cholangio- und Hepatozytenschädigung aggravieren. Aber auch weit unterhalb ihrer kritischen mizellären Konzentration können Gallensäuren eine Leberzellschädigung induzieren.

Gegenüber dem Modell des von extrazellulär durch Membranwechselwirkungen ausgelösten Zellschadens wurde daher das Konzept einer von intrazellulär hervorgerufenen Zellschädigung bei Cholestase zunehmend favorisiert. Da ausgedehnte Nekrose bei cholestatischen Leberkrankheiten in der Regel nicht zu beobachten ist, wurde von Patel *et al.* 1995 spekuliert, dass der Untergang der Hepatozyten bei Cholestase überwiegend durch Apoptose hervorgerufen wird^{33, 2}.

Tatsächlich wurde die Fähigkeit von Gallensäuren, Apoptose in Leberzellen auszulösen, schon vielfach beschrieben³⁴⁻³⁶. Ausmaß und Progression der Leberschädigung sind dabei bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten maßgeblich vom Gleichgewicht zwischen toxischen und nichttoxischen Gallensäuren abhängig²⁹.

Die quantitativ bedeutendste hydrophobe, toxische Gallensäure des Menschen ist Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA), die als hauptverantwortlich für Gallensäuren-induzierten Leberzellschaden bei Cholestase angesehen wird. GCDCA kann in Hepatozyten *in vitro* direkt Apoptose auslösen, ein Mechanismus, der von Rust *et al.* und anderen beschrieben und charakterisiert wurde³⁷⁻⁴².

Die Cholestase-induzierende und hepatotoxische Wirkung einer weiteren hydrophoben Gallensäure, Taurolithocholsäure (TLCA), wird im Folgenden (**Kap. 1.1.1.2**) eingehend besprochen.

1.1.1.2 Das Modell Taurolithocholsäure (TLCA)-induzierter Cholestase in der isoliert perfundierten Rattenleber

Schon in den 1950er Jahren wurden Wirkungen von Gallensäuren auf die Leberfunktion in Ratten untersucht⁴³. Seither wurde die isoliert perfundierte Rattenleber als Modell zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in der intakten Leber weiter etabliert^{9, 44-46}. Parameter, die dabei zur Beurteilung der Leberfunktion unter Einfluss von Gallensäuren erfasst werden können, sind unter anderem quantitativer Gallenfluß, die hepatobiliäre

Transportkapazität für Gallensäuren^{47, 48} oder für Substrate der Konjugatexportpumpe Mrp2⁴⁹, sowie die Freisetzung von Markerenzymen der Leberzellschädigung wie Laktatdehydrogenase (LDH) in das Perfusionsmedium⁵⁰. Die technische Durchführung der isolierten Rattenleberperfusion wird in **Kap. 2.1** ausführlich beschrieben.

Lithocholsäure (LCA) ist eine sekundäre Gallensäure, die physiologisch von intestinalen Bakterien aus der primären, d.h. der von Hepatozyten aus Cholesterol synthetisierten Gallensäure Chenodeoxycholsäure (CDCA) oder der sekundären Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) durch Dehydroxylierung gebildet wird⁵¹. LCA und ihre Konjugate sind die am stärksten cholestatisch wirkenden der quantitativ wichtigen Gallensäuren des Menschen: LCA, CDCA, DCA, Cholsäure (CA) und UDCA^{9, 32, 52}.

Die Auslösung einer akuten Cholestase durch das Taurinkonjugat der LCA, TLCA, nach deren systemischer Infusion bei Ratten wurde 1966 von Javitt erstmals beschrieben⁹.

In 10 mikromolarer Konzentration über die Pfortader in die intakte Leber infundiert, induziert TLCA eine akute Cholestase und es kommt zu einem fast vollständigen Versiegen des Gallenflusses. **Abbildung 1** zeigt dies exemplarisch. Dargestellt ist der Gallenfluß von mit TLCA behandelten Lebern im Vergleich zu Kontrollen über die Zeit in µl Gallenfluß pro Gramm Lebergewicht pro min aus Versuchen von Beuers *et al.* 2003⁵⁰.

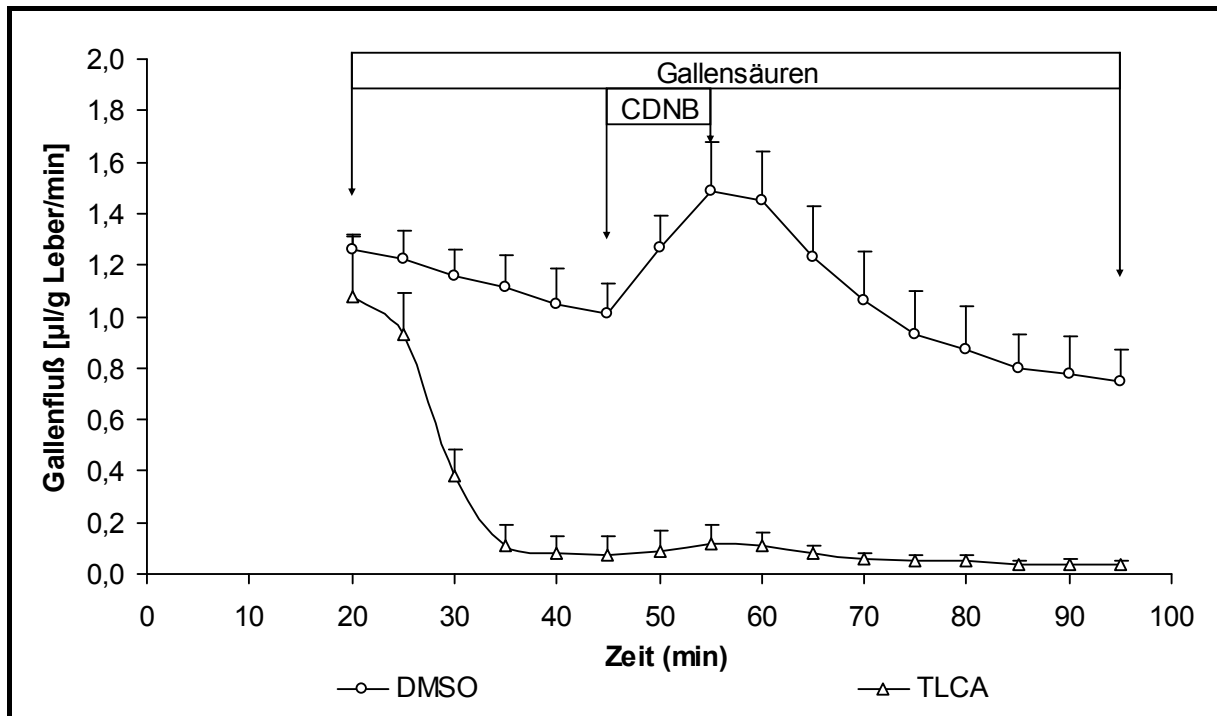


Abbildung 1: TLCA-induzierte Cholestase in der Rattenleber
(TLCA, 10 µmol/l; MW ± SD, n = 5, nach Daten aus ^{32, 50})

Immunelektronenmikroskopisch wurde gezeigt, dass TLCA in so behandelten Lebern die kanalikuläre Dichte von für die Gallenbildung essentiellen Transportproteinen wie der Konjugatexportpumpe Mrp2 (Abcc2) und des apikalen Gallensäuretransporters „bile salt export pump“ Bsep (Abcb11) signifikant reduziert ^{53, 54} (s. **Abbildung 2**), was als (mit-)ursächlich für die beobachtete Cholestase unter TLCA angenommen werden kann. Dieser Befund ist unter anderem deshalb von Bedeutung, da er in Analogie zu Beobachtungen bei Patienten mit chronischen cholestatischen Leberkrankheiten steht, bei welchen eine Reduktion der Transporterdichte im Lebergewebe gezeigt wurde. So wiesen Patienten im Spätstadium der PBC (Stadium IV) immunhistologisch eine verminderte Dichte von MRP2 Protein im Lebergewebe im Vergleich zu Patienten mit anderen, nicht-cholestatischen Lebererkrankungen auf ⁵⁵. In Leberbiopsien von Patienten mit PSC fand sich auf der Ebene der mRNA ebenfalls eine signifikant reduzierte Expression von MRP2 im Vergleich zu Patienten mit nicht-cholestatischen Lebererkrankungen ⁵⁶.

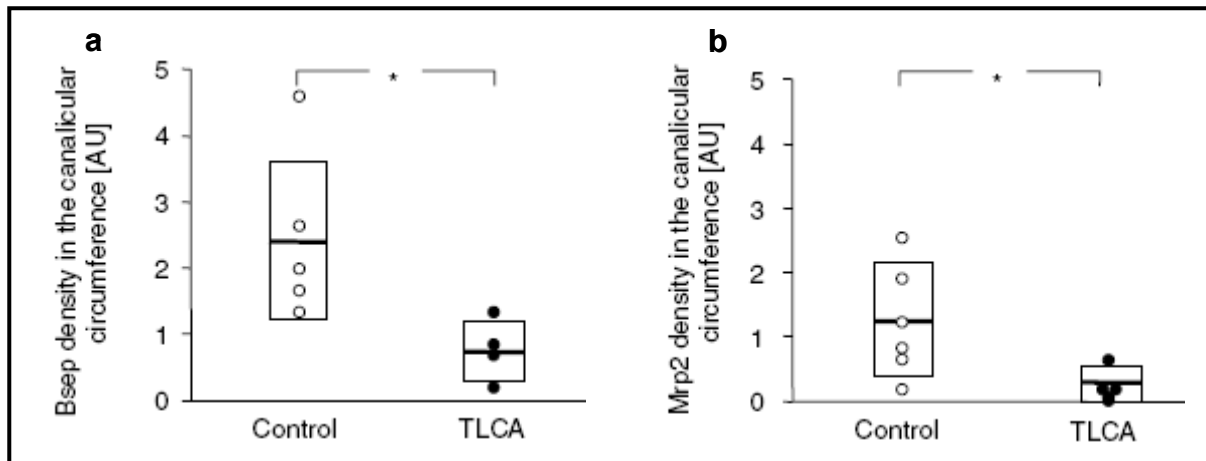


Abbildung 2: Effekt von TLCA auf die kanalikuläre Dichte der Transportproteine a) Bsep und b) Mrp2 in Rattenlebern, Ausschnitte aus ^{53, 54} (n = 4-6, *p<0,05)

In Folge der reduzierten Transporterdichte ist unter TLCA-Behandlung auch die Sekretion von gallenpflichtigen Substraten in die Galle erheblich eingeschränkt. In Versuchsreihen von Beuers *et al.* 2001 fand sich eine im Vergleich zu Kontrollen um 95% reduzierte Sekretion des Mrp2-Substrats 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion (GS-DNP) in die Galle ⁵³.

Interessant ist schließlich die Beobachtung, dass unter Behandlung mit TLCA die hepatovenöse Konzentration des Mrp2-Substrats GS-DNP massiv ansteigt*. Dies spiegelt den Anstieg des Cholestaseparameters Bilirubin im Serum von Patienten mit chronischer cholestatischer Leberkrankheit wider, dessen Konjugate ebenfalls Substrate von MRP2 sind.

In der Vergangenheit wurden Teile der für die TLCA-induzierten Effekte verantwortlichen hepatozellulären Signalwege entschlüsselt. So scheint TLCA in höheren mikromolaren Konzentrationen den Kalziumeinstrom in die Zelle zu behindern ^{57, 58}. Ferner aktiviert TLCA membrangebundene PKC in isolierten Hepatozyten ^{53, 59, 60} und reduziert die Membranbindung der Ca⁺⁺-abhängigen cPKC α , einem Vermittler gezielter hepatozellulärer Exozytose. Die kalziumunabhängige nPKC ϵ hingegen wird von TLCA selektiv an die Hepatozytenmembran transloziert ^{50, 60}. Eine Aktivierung von membrangebundener nPKC ϵ wurde schon früher als Mittler gestörter Insertion von (Transport-) Proteinen

* Unveröffentlichte Beobachtung S. Hohenester, R. Wimmer, U. Beuers

in deren Zielmembran diskutiert. Daher wird ein Zusammenhang zwischen einer Aktivierung der nPKC ϵ und einer Hemmung der hepatozellulären Sekretion durch TLCA angenommen^{50,60}, konnte aber bisher nicht eindeutig belegt werden.³²

nPKC ϵ wird abhängig von Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) phosphoryliert⁶¹ und aktiviert^{62, 63}. Da, ebenfalls im Modell der perfundierten Rattenleber, die Abhängigkeit TLCA-induzierter Cholestase von PI3-Kinase-Aktivität gezeigt wurde⁵⁰, scheint ein kombinierter PI3-Kinase/nPKC ϵ -abhängiger Signalweg für die Vermittlung des cholestatischen Effekts denkbar (**s. Abbildung 6, Kap. 1.1.2.3**). Zur weiteren Bedeutung der PI3-Kinasen für Gallensäuren-induzierte Signale siehe **Kap. 1.1.3**.

1.1.1.3 Hepatobiliäre Transportmechanismen und deren Regulation bei Cholestase

Eine wesentliche Aufgabe der Hepatozyten ist neben ihrer Stoffwechselfunktion der gerichtete und selektive Transport einer Vielzahl von Substanzen aus dem Blut in die Galle. Dies geschieht durch ausgewogene Expression und Regulation von Transportsystemen an der sinusoidalen (basolateralen) Membran zur Aufnahme und an der kanalikulären (apikalen) Membran zur Sekretion gallenpflichtiger Substanzen. Die Sekretionskapazität des Hepatozyten wird dabei von Anzahl und Aktivität der Transportproteine in die Zielmembran bestimmt. Unter Cholestase erfahren die Transportsysteme des Hepatozyten komplexe Veränderungen. Die mangelnde Elimination und Ausscheidung hydrophober Gallensäuren und anderer potentiell toxischer Substanzen wird dabei zur Hauptursache der Leberzellschädigung bei Cholestase (**s. Kap. 1.1.1.1**). Dabei ist es teilweise schwierig zu differenzieren, ob diese Veränderungen ursächlich für die Entstehung der Cholestase sind oder als Folge davon entstehen.

Die Extraktion von Gallensäuren, organischen Anionen und Medikamenten aus dem Blut über die sinusoidale Plasmamembran der Hepatozyten wird zum Großteil von zwei Transportsystemen bewerkstelligt, dem Na⁺-abhängigen Transportsystem „Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide“ (Ntcp) und einer Familie von Na⁺-unabhängigen Transportern, den sog. „organic anion transporting polypeptides“

(Oatps). Ntcp ist dabei der prädominante Transporter für Gallensäuren, während den Oatps neben dem Gallensäuretransport die zentrale Rolle in der Aufnahme organischer Anionen zufällt^{64, 65}.

Auf der kanalikulären Seite des Hepatozyten sind eine Reihe von Transportern für die Gallenbildung und die Elimination gallenpflichtiger Substanzen verantwortlich. Die Exkretion monovalenter Gallensäuren erfolgt hauptsächlich über die sog. „bile salt export pump“ (Bsep), während divalente, sulfatierte und glukuronidierte Gallensäuren gemeinsam mit organischen Anionen wie Bilirubin- und anderen Glutathionkonjugaten über die Konjugatexportpumpe „multidrug resistance-associated protein 2“ (MRP2) sezerniert werden^{64, 66, 67}. MRP2 ist damit der wichtigste Mediator des gallensäurenunabhängigen Gallenflusses.

Das „multidrug resistance protein“ Mdr2 (in Ratte/Maus) bzw. MDR3 (beim Menschen) scheidet Phospholipide in die Galle aus, welche gemeinsam mit Gallensäuren und Cholesterin gemischte Mizellen bilden und entscheidend zum Schutz der apikalen hepatozellulären und cholangiozellulären Membranen vor potentiell toxischen Gallenbestandteilen beitragen.

Bei Fehl- oder Minderfunktion der apikalen Transportsysteme im Rahmen einer Cholestase existiert an der basolateralen Seite über weitere Isoformen des multidrug resistance-associated proteins ein alternativer Weg der Ausscheidung von organischen Anionen (z.B. Mrp3) und Gallensäuren (Mrp4)⁶⁸. Diese basolateralen Transportproteine werden bei Cholestase teils deutlich vermehrt exprimiert. Unter ihnen ist MRP4 im Menschen der wichtigste basolaterale Gallensäuretransporter.

Unter Cholestase zeigen die Transportsysteme der Hepatozyten eine adaptive Antwort auf die intrazelluläre Belastung mit Gallensäuren und anderen toxischen Substanzen, die vermutlich dem Schutz der Hepatozyten dient. So wird Ntcp aus der Plasmamembran entfernt und auf mRNA Ebene herunterreguliert⁶⁹⁻⁷², was den Hepatozyten vor einer weiteren Aufnahme von Gallensäuren schützt. Auch die Expression von OATP scheint in Patienten mit chronischen cholestatichen Leberkrankheiten vermindert zu sein⁵⁶. Die Expression von Bsep an der kanalikulären Membran und damit die Möglichkeit der Gallensäuresekretion bleibt jedoch aufrechterhalten. Da Mrp2 an der apikalen Membran dagegen stark herunterreguliert wird, werden kompensatorisch die basolateralen Effluxsysteme für organische Anionen und Gallensäurenkonjugate (Mrp1, Mrp3) hochreguliert^{56, 73, 74}.

Die sekretorische Kapazität der Transportsysteme an ihrer jeweiligen Zielmembran kann dabei prinzipiell über drei verschiedene Mechanismen dem Bedarf angepasst und moduliert werden: durch Regulation der Expression der für die Transportsysteme kodierenden Gene, durch Stimulation oder Hemmung des Ein- und Ausbaus der Transportproteine in bzw. aus deren jeweiliger apikaler oder basolateraler Zielmembran und letztendlich durch direkte Regulation von deren Aktivität, beispielsweise durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Gallensäuren scheinen in diesem Zusammenhang auf allen drei Ebenen wichtige Mediatoren zu sein ^{68, 75} (s. Kap. 1.1.2.1 und 1.1.2.2). ²

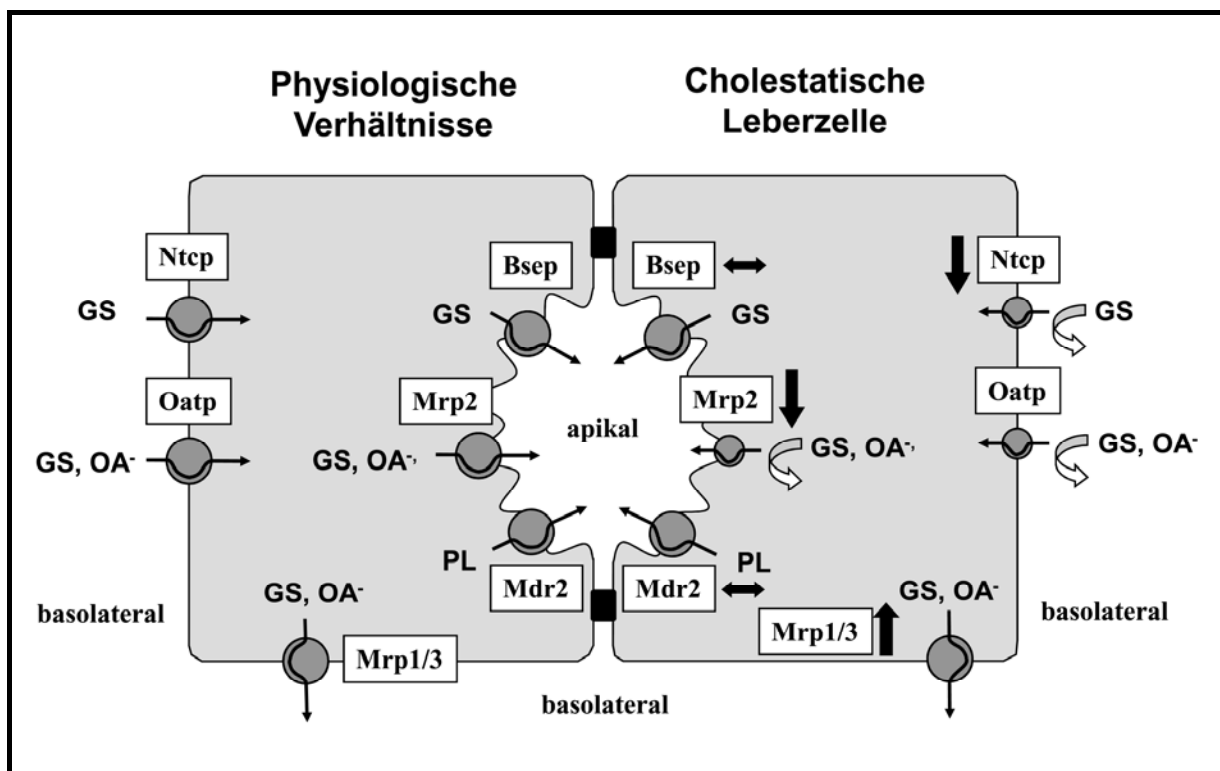


Abbildung 3: Hepatobiliäre Transportmechanismen (nach ²)

1.1.2 Therapie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten und experimenteller Cholestase

UDCA ist eine physiologisch im Menschen vorkommende sekundäre Gallensäure, die endogen durch intestinale Bakterien aus der primären Gallensäure CDCA epimerisiert wird und bis zu 3% des Gallensäurepools des Menschen ausmacht. In der traditionellen chinesischen Medizin wurde UDCA in Form getrockneter Bären-galle schon seit der Tang Dynastie (618-907 n. Chr.) zur Therapie u.a. der

Gelbsucht eingesetzt⁷⁵⁻⁷⁷. In der modernen Medizin findet industriell synthetisierte UDCA in der konservativen Therapie der Cholezystolithiasis seit 1975 klinisch Anwendung und zeigte sich dabei extrem nebenwirkungsarm und sehr gut verträglich⁷⁸. In der Therapie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten wie PBC und PSC stellt UDCA heute die einzige etablierte pharmakologische Therapieoption dar⁷⁸⁻⁸¹. Seit Anfang der 1990er Jahre wurde in mehreren randomisierten, Placebo-kontrollierten Studien gezeigt, dass UDCA langfristig die laborchemischen Befunde von Patienten mit chronischen cholestatischen Leberkrankheiten verbessern, die Sekretionsleistung der Leber steigern und die Serumspiegel von Bilirubin senken kann und damit den wichtigsten prognostischen Marker sowohl der PBC als auch der PSC positiv beeinflusst⁸²⁻⁸⁵.

Bei Patienten mit **PBC** verzögert bzw. verhindert UDCA die Entwicklung einer Leberfibrose bzw. -zirrhose⁸⁶ sowie deren Komplikationen, kann das transplantationsfreie Überleben verlängern⁸⁷, verbessert die Lebensqualität der Patienten und normalisiert die Langzeitprognose für Patientinnen im Frühstadium der PBC sowie für solche, die laborchemisch gut auf die UDCA-Behandlung ansprechen^{85, 88, 89}. Neueste Untersuchungen zeigen, dass bei Patienten im Stadium I-II der PBC die Lebenserwartung nach 20 Jahren unter Therapie mit UDCA derjenigen der Normalbevölkerung entspricht⁸⁵. Als zusätzliche Therapieoption scheint nach ersten Untersuchungen eine Kombination von UDCA mit dem Glukokortikoid Budesonid günstige Effekte auf laborchemische und histologische Parameter in Frühstadien der PBC zu haben, Langzeituntersuchungen an größeren Patientenkollektiven im Rahmen kontrollierter Studien bleiben aber abzuwarten. Andere medikamentöse Therapieoptionen sind bisher nicht etabliert.

Auch bei Patienten mit **PSC** hat UDCA neben der Verbesserung des prognostisch bedeutsamen Serumbilirubinspiegels teilweise günstige Effekte auf histologische und cholangiographische Parameter^{82, 83}. Die für die PBC gut belegten positiven Effekte auf Ausbildung und Fortschreiten einer Fibrose bzw. Zirrhose der Leber sowie auf Lebensqualität und Langzeitprognose der Patienten sind jedoch für die PSC noch nicht klar belegt, da bisher keine Studien mit adäquater Fallzahl, Beobachtungszeit und Qualität des Studiendesigns zum sicheren Nachweis dieser Effekte vorliegen. Allerdings scheint die Therapie mit UDCA einen günstigen Effekt auf die Entwicklung

von Gallengangskarzinomen zu haben und das Risiko für Kolonkarzinome bei Patienten mit PSC und Colitis ulcerosa zu senken⁹⁰. Zusätzlich zur Therapie mit UDCA müssen die für die PSC typischen Stenosen der großen Gallenwege z.B. in einer endoskopisch retrograden Cholangiographie (ERC), dilatiert bzw. mit Stents überbrückt werden, um ungestörten Gallenabfluss sicherzustellen.

Anticholestatische Effekte von UDCA werden auch bei anderen cholestatischen Lebererkrankungen beobachtet und genutzt, so bei der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase, der chronischen „Graft-versus-Host Disease“, der Medikamenten-induzierten Cholestase, der cholestatischen Leberkrankheit bei zystischer Fibrose sowie verschiedenen pädiatrischen cholestatischen Syndromen wie den progressiven familiären intrahepatischen Cholestasen (PFIC)^{79, 91-93}.

1.1.2.1 Wirkmechanismen der UDCA bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten

Obwohl UDCA seit Jahrzehnten pharmakologisch verwendet wird und heute für eine Reihe von cholestatischen Leberkrankheiten die einzig bekannte und suffiziente pharmakologische Therapieoption darstellt (s. **Kap. 1.1.1** und **1.1.2**), sind die genauen molekularen Wirkmechanismen der UDCA gegenwärtig noch weitgehend ungeklärt. Derzeit diskutierte Konzepte zur Wirkung von UDCA beinhalten eine Verbesserung der bei Cholestase gestörten hepatobiliären und cholangiozellulären Sekretion, den Schutz der Hepatozyten gegen Gallensäuren-induzierte Apoptose, den Schutz von Gallengangszellen gegen zytotoxische hydrophobe Gallensäuren, eine verminderte Gallensäurenreabsorption im Ileum und immunomodulatorische Eigenschaften⁷⁵.

Stimulation der hepatozellulären Sekretion

Die durch Akkumulation von Gallensäuren und anderen potentiell toxischen Substanzen unter Cholestase induzierte Leberzellschädigung wird als ein entscheidender Pathomechanismus chronischer cholestatischer Leberkrankheiten angesehen (s. **Kap.1.1.1.1**). Bei Patienten mit PBC oder PSC stimuliert UDCA die biliäre Sekretion von Gallensäuren⁹⁴ und normalisiert die unter Cholestase erhöhten

Serumspiegel sowohl des gallenpflichtigen Bilirubins als auch der quantitativ wichtigsten hydrophoben Gallensäure CDCA im Serum^{79, 95}. Durch diese gesteigerte hepatozelluläre Sekretion werden hepatotoxische Substanzen aus der Leber eliminiert und toxische Schäden vermieden. Die hepatozelluläre Sekretionskapazität ist dabei abhängig von Anzahl und Aktivität der Transportproteine an der basolateralen und, wichtiger, der kanalikulären Membran der Hepatozyten. Anzahl und Aktivität der Transporter sind abhängig von Expression, gerichtetem Einbau in die jeweilige Zielmembran sowie direkte Aktivierung, wobei UDCA alle drei Schritte positiv zu beeinflussen scheint.

Auf Ebene der **Genexpression** führte orale Substitution von UDCA wie die von Cholsäure in Mäusen zu einer Steigerung der mRNA-Spiegel der wichtigsten kanalikulären Transportproteine Bsep und Mrp2⁹⁶. Auch beim Menschen wurde in Western Blots aus Lebergewebe eine erhöhte Expression der kanalikulären Transporter BSEP, MDR3 und des basolateralen Gallensäuretransporters MRP4 unter Behandlung mit UDCA gezeigt, die allerdings bei fehlendem Nachweis von Veränderungen der mRNA am ehesten durch posttranskriptionelle Mechanismen zu erklären ist⁹⁷.

Posttranslational aktiviert das Taurin-Konjugat von UDCA (TUDCA) im Tier- und Zellmodell eine Reihe von komplexen Signalwegen, die zu einer Stimulation der vesikulären Exozytose und damit zum Einbau von Transportproteinen in ihre apikale Zielmembran führen^{53, 54, 98}. Die diesem posttranslationalen Effekt zugrunde liegenden Signalwege sind Gegenstand von **Kap.1.1.2.3**.

Zur direkten **Aktivierung von Transportproteinen** durch (T)UDCA gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Jedoch phosphorylierte der TUDCA Effektor cPKC α (s. **Kap. 1.1.2.3**), in transfizierten Insektenzellen die Gallensäurenexportpumpe Bsep, woraus eine erhöhte Transportkapazität dieses Proteins resultierte⁹⁹.

Schutz von Hepatozyten gegen Gallensäuren-induzierte Apoptose

Akkumulation von hydrophoben Gallensäuren in Hepatozyten führt zu Apoptose und Nekrose und kann in der Folge eine inflammatorische Reaktion auslösen, die zur Fibrose der Leber führt⁷⁵ (s. **Kap. 1.1.1.1**). In *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen an Ratten und in primären humanen Hepatozyten erwies sich UDCA dabei als potentes antiapoptotisches Agens^{34, 100, 101}. An der Vermittlung der antiapoptotischen Effekte von UDCA scheinen je nach untersuchtem Modell der Epidermale Wachstumsfaktor-

Rezeptor (EGF-R), die Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ¹⁰² und der Glukokortikoidrezeptor ¹⁰³ beteiligt. Trotz der klaren antiapoptotischen Effekte der UDCA im Modell wird die Rolle der Apoptose in der Pathogenese der chronischen cholestatischen Leberkrankheiten sowie die Bedeutung der antiapoptotischen Effekte der UDCA für ihre therapeutischen Potenz im Menschen kontrovers diskutiert ¹⁰⁴.

Schutz des Gallengangepithels vor der Zytotoxizität hydrophober Gallensäuren

Bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten sind die Gallengangsepithelien das primäre Ziel der immunvermittelten Leberschädigung. Obwohl die hier zugrunde liegenden Mechanismen bisher weitgehend ungeklärt sind, wird angenommen, dass die hohen millimolaren Konzentrationen hydrophober Gallensäuren in der Galle bei der cholangiozellulären Schädigung eine wichtige Rolle spielen ^{105, 106}. Behandlung mit UDCA schützt Cholangiozyten dabei vor der Zytotoxizität hydrophober Gallensäuren. UDCA „puffert“ in der Galle hydrophobe Gallensäuren durch Mizellenbildung ab ¹⁰⁶ und verschiebt das Gleichgewicht weg von den toxischen hydrophoben zu den eher protektiven hydrophilen Gallensäuren ¹⁰⁷. Schließlich schützt die durch UDCA verminderte apikale Aufnahme von hydrophoben Gallensäuren in die Cholangiozyten diese vor intrazellulären zytotoxischen Effekten ¹⁰⁸. Die unter UDCA-Therapie histologisch verminderte periportale Entzündungsreaktion bei Patienten mit PBC und PSC kann dabei als Indiz für die klinische Relevanz der verminderten cholangiozellulären Schädigung unter UDCA dienen ^{83, 95}.

Verminderte Gallensäurenabsorption im Ileum

UDCA scheint bei Gesunden wie bei Patienten mit PBC die Wiederaufnahme konjugierter Gallensäuren über den „apical sodium dependent bile acid transporter“ ASBT im Ileum zu vermindern ^{109, 110}. Der dadurch bedingte verminderte Rückstrom von hydrophoben Gallensäuren aus dem Ileum in die Leber könnte den anticholestatischen Effekt der UDCA unterstützen ⁷⁵.

Immunomodulation

Schließlich wurden auch immunomodulatorische Effekte der UDCA diskutiert. UDCA beeinflusst in peripheren Monozyten die Ausschüttung von Zytokinen ^{111, 112} und normalisiert die aberrante Expression von HLA Klasse I Molekülen auf Hepatozyten

von Patienten mit PBC und PSC^{83, 113}. Diese Beobachtungen sind jedoch eher deskriptiv und ihre klinische Relevanz erscheint noch unklar.

1.1.2.2 Anticholestatische Wirkung von TUDCA im Cholestasemodell

Die hydrophobe Gallensäure TLCA induziert in isoliert perfundierten Rattenlebern eine Cholestase und führt zu reduziertem Gallenfluß, verminderter kanalikulärer Dichte von Transportproteinen und verminderter Sekretion des Modellanions der Konjugatexportpumpe Mrp2, GS-DNP (s. **Kap.1.1.1.2**). Das Taurin-Konjugat von UDCA (TUDCA) hebt in diesem Cholestasemodell die TLCA-induzierten Effekte auf und normalisiert die Leberfunktion vollständig.

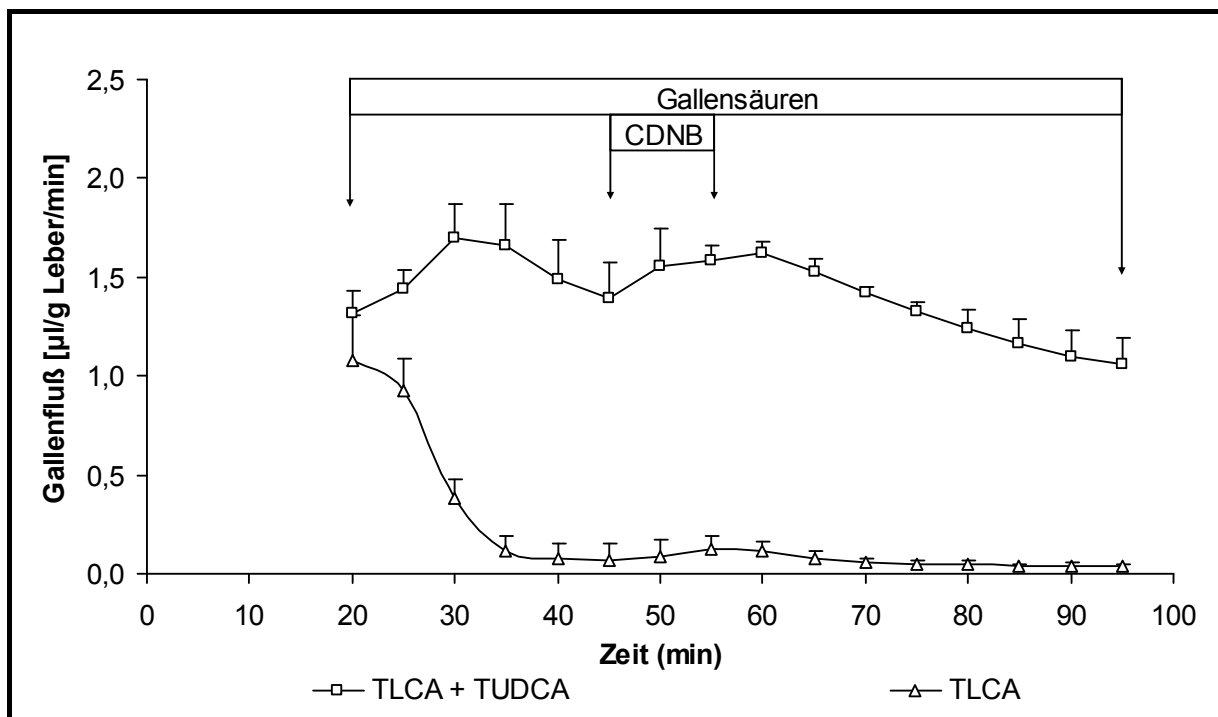


Abbildung 4: Antagonisierung der TLCA-induzierten Cholestase durch TUDCA in der Rattenleber (MW ± SD, n = 5, nach Daten aus^{32, 50})

So antagonisierte TUDCA in Versuchen von Beuers *et al.*⁵⁰ die TLCA-bedingte Störung des Gallenflusses in der isoliert perfundierten Rattenleber bei gleichzeitiger Infusion von 10µmol/l TLCA und 25µmol/l TUDCA (s. **Abbildung 4**). Immuielektronenmikroskopisch zeigte sich in so behandelten Lebern eine Normalisierung der durch TLCA verminderten Dichte der für die Gallenbildung bedeutsamen Transportproteine Mrp2 und Bsep an der kanalikulären Membran fast

auf Kontrollniveau^{53, 54} (s. **Abbildung 5**). Auch die durch TLCA verminderte hepatozelluläre Sekretion von organischen Anionen normalisiert sich unter TUDCA. In Versuchen von Beuers *et al.*⁵⁰ verbesserte Koadministration von TUDCA zusätzlich zu TLCA signifikant die Ausscheidung des Modellanions GS-DNP von 5% unter TLCA alleine auf 73%, bezogen auf unbehandelte Kontrollen.

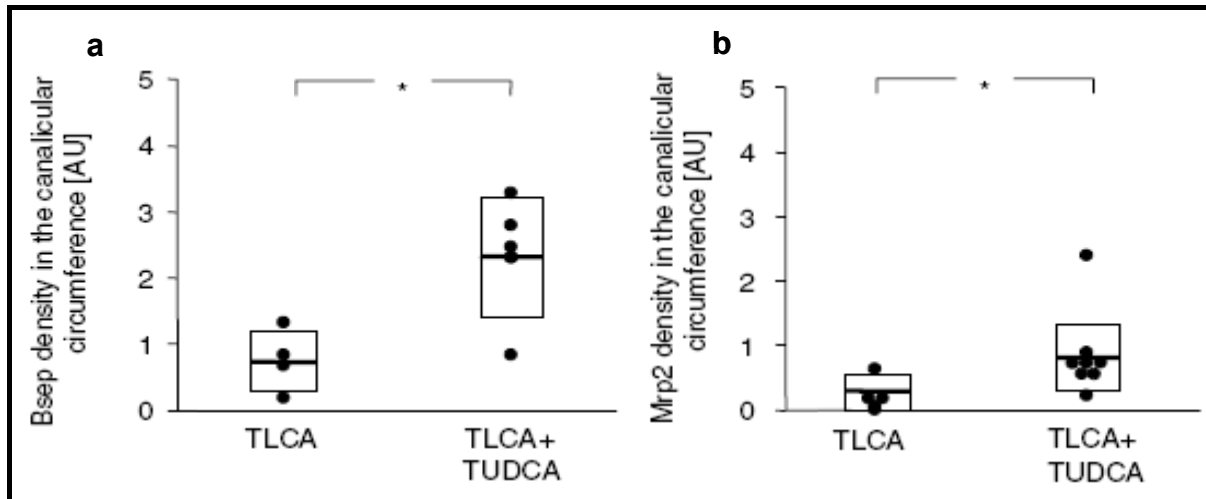


Abbildung 5: Effekt von TUDCA auf die kanalikuläre Dichte der Transportproteine a) Bsep und b) Mrp2 in Rattenlebern unter TLCA-induzierter Cholestase, Ausschnitte aus^{53, 54} (n = 4-7, *p<0,05)

Schließlich nivelliert Koadministration von TUDCA in der isoliert perfundierten Rattenleber die hepatovenöse Akkumulation des Mrp2-Substrats GS-DNP, die sich unter Behandlung mit TLCA beobachten lässt*. Dies spiegelt die Situation von Patienten mit chronischen cholestatischen Leberkrankheiten wider, bei welchen UDCA ebenfalls die erhöhten Serumspiegel von Bilirubin normalisiert, dessen Konjugate Substrate von MRP2 sind⁸²⁻⁸⁵.

* Unveröffentlichte Beobachtung S. Hohenester, R. Wimmer, U. Beuers

1.1.2.3 Vermittlung von TUDCA-Signalen in der gesunden und cholestatischen Leber

Die anticholestatische Wirkung von UDCA bei Patienten mit chronischen cholestatischen Leberkrankheiten und in experimenteller Cholestase wird auf Ebene der Hepatozyten entscheidend auf posttranskriptionelle Mechanismen zurückgeführt. Bereits 1993 diskutierten Beuers *et al.* den zielgerichteten Einbau von Transportproteinen in die kanalikuläre Hepatozytenmembran als Schlüsselmechanismus zur Verbesserung der sekretorischen Kapazität von cholestatischen Lebern⁴⁶, ein Konzept, das auch von anderen Gruppen aufgenommen wurde^{48, 114, 115}. Seither konnte sowohl in Modellen experimenteller Cholestase als auch unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden, dass Gallensäuren tatsächlich den Einbau bzw. Ausbau von wichtigen Transportproteinen in bzw. aus der kanalikulären Membran von Hepatozyten stimulieren. Die hydrophobe Gallensäure TLCA bewirkt in der isoliert perfundierten Rattenleber^{53, 54} und in primären Rattenhepatozyten⁶⁹ einen Ausbau der Konjugatexportpumpe Mrp2 sowie der Gallensäurenexportpumpe Bsep aus der kanalikulären Hepatozytenmembran. Dagegen führt TUDCA in diesen Lebern zur gezielten Insertion von Mrp2 und Bsep in die kanalikuläre Hepatozytenmembran^{53, 54} (s. **Kap. 1.1.2.2**). Auch in nicht-cholestatischen Hepatozyten wurde dieser Effekt beobachtet und führt hier zu einer Stimulation der Gallensekretion über das Kontrollniveau hinaus, was als Choleresese bezeichnet wird^{32, 50, 98, 116}. Die dieser anticholestatischen und choleretischen Wirkung der TUDCA zugrunde liegenden signalmodulatorischen Mechanismen sind zum Teil aufgeklärt und scheinen sich im Zustand der Cholestase grundlegend von den Verhältnissen in nicht-cholestatischen, „gesunden“ Hepatozyten zu unterscheiden (s. **Abbildung 6**).

TUDCA bewirkt als einzige Gallensäure in isolierten Hepatozyten einen anhaltenden Anstieg des freien zytosolischen Kalziums ($[Ca^{++}]_i$) und des Ca^{++} -Einstroms aus mikrosomalen Kalziumspeichern^{57, 117} und über nickelsensitive Kalziumkanäle in der Plasmamembran^{46, 57, 117}. In frühen Versuchen erwies sich die TUDCA-induzierte Exozytose in cholestatischen und nicht-cholestatischen Rattenlebern zudem als Ca^{++} -abhängig⁴⁶. Darüber hinaus führt TUDCA zu einer selektiven Translokation der kalziumsensitiven α -Isoform der Proteinkinase C (cPKC α), einem Schlüsselenzym

der kalziumstimulierten Exozytose¹¹⁸, an die hepatozelluläre Membran¹¹⁹⁻¹²¹. Diese Beobachtungen machten in der Zusammenschau die cPKC α unter den denkbaren intrazellulären Signalmediatoren früh zu einem Kandidaten für die Vermittlung TUDCA-induzierter Signale. In einer Arbeit aus 2001 konnten Beuers *et al.* schließlich zeigen, dass die Antagonisierung der TLCA-induzierten Reduktion der hepatozellulären Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP durch TUDCA von einem Inhibitor der cPKC α , Bisindolylmaleimid I (BIMI), gehemmt wird⁵³. Auch eine von Milikiewicz *et al.* berichtete TUDCA-induzierte Steigerung der Gallensäuresekretion in Kanalikuli TLCA-behandelter Rattenhepatozytencouplets wird als Kalzium- und PKC-abhängig angenommen¹²². (s. **Abbildung 6**, linke Seite)

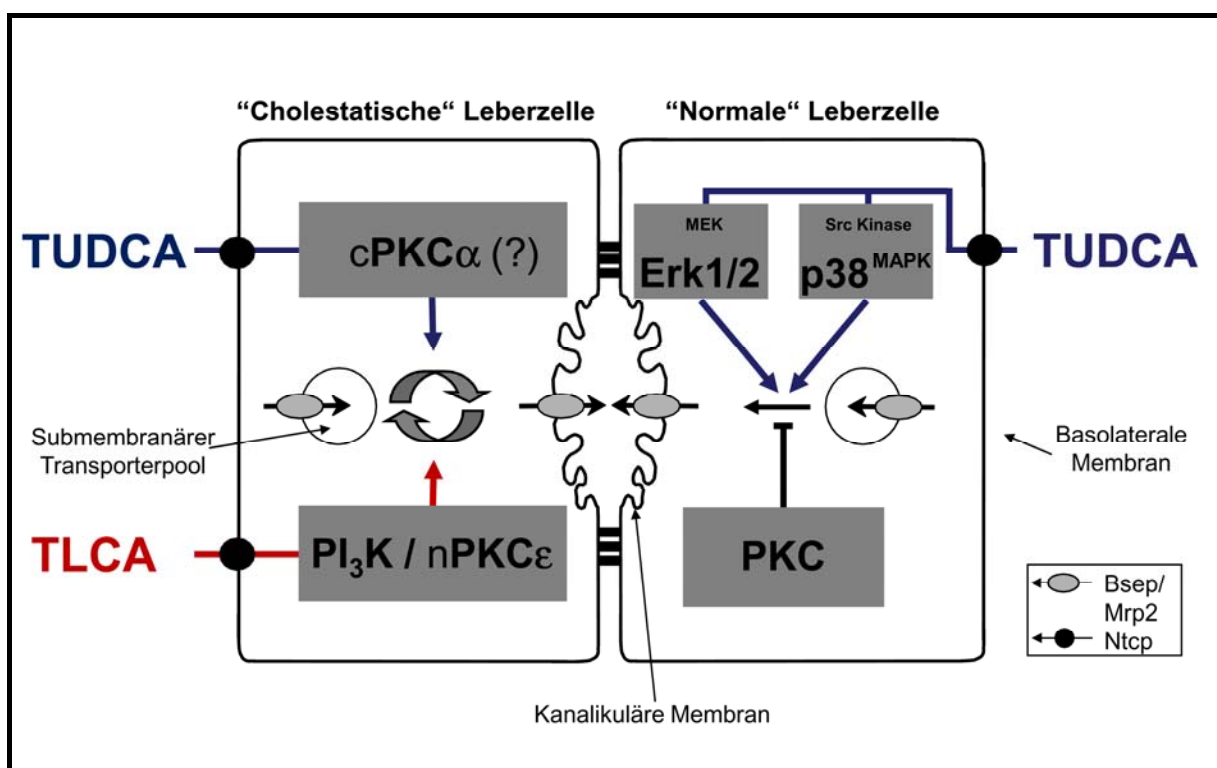


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung Gallensäure-induzierter Signalwege in cholestatistischen und normalen Hepatozyten

In nicht-cholestatistischen Hepatozyten jedoch wurde die Bedeutung der cPKC α für die TUDCA-induzierte Exozytose in Frage gestellt. So löste in Experimenten von Kubitz *et al.* 2004 der cPKC α -Agonist Thymeleatoxin seinerseits in primär nicht-cholestatistischen isoliert perfundierten Rattenlebern eine Cholestase aus und führte zum Ausbau des Gallensäuretransporters Bsep aus der kanalikulären Membran von Hepatozyten¹²³, was mit früheren Ergebnissen derselben Arbeitsgruppe übereinstimmt. Schon 2001 berichtete Kubitz von einer durch den PKC-Agonisten

PMA ausgelösten Cholestase in isoliert perfundierten Rattenlebern und zeigte eine Translokation der Konjugatexportpumpe Mrp2 von der kanalikulären an die basolaterale Membran¹²⁴. Dagegen wurden in diesem nicht-cholestatischen Modell andere Signalmediatoren für die TUDCA-induzierte Cholestase und Insertion von Transportproteinen in die kanalikuläre Membran verantwortlich gemacht. Hier scheinen Proteine der Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) „Extracellular-signal regulated Kinase“ (Erk1/2) und p38 (p38^{MAPK}) und deren Aktivatoren MAPK-Kinase (MEK) bzw. Src-Kinasen essentiell für TUDCA-induzierte Signale zu sein^{98, 116, 125}. (s. **Abbildung 6**, rechte Seite)

Wiederholt wurde auch der Einfluss von Protein Kinase A (PKA) auf apikale Sekretion in Hepatozyten und anderen Zelltypen diskutiert. Ein konvergenter cPKC α -PKA-Signalweg potenziert in β -Zellen des Pankreas die Insulinsekretion¹²⁶. Auch die „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)-abhängige Chlorid-Sekretion in *Xenopus* Oozyten wird PKC-/PKA-abhängig stimuliert¹²⁷. In Hep G2 Hepatomzellen fördert PKA darüber hinaus die Ausbildung und Aufrechterhaltung der apikalen Membrandomäne und der Polarität der Zellen¹²⁸. Zudem bestehen eine Reihe von Parallelen zwischen den PKA-abhängigen Wirkungen von cAMP und (T)UDCA-induzierten Signalen in Hepatozyten. Beide erhöhen die intrazellulären Ca⁺⁺ Spiegel, wirken antiapoptotisch, stimulieren die Exozytose, führen zum zielgerichteten Einbau kanalikulärer Transportproteine wie Mrp2 oder Mdr2 und erhöhen die Transportkapazität von Hepatozyten für Gallensäuren¹²². Eine unmittelbare Rolle von PKA in (T)UDCA-induzierten Signalen konnte jedoch bisher nicht belegt werden¹²⁰.

1.1.3 Phosphatidylinositol-3-Kinasen: Mediatoren von Gallensäureeffekten

1.1.3.1 Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen)

Enzyme aus der Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) kommen in fast allen Geweben der Säugetiere vor und werden mit einer Vielzahl grundlegender zellulärer Funktionen wie Zellwachstum, -proliferation, -migration und -überleben in Zusammenhang gebracht. Sie katalysieren die Phosphorylierung von

Phosphatidylinositol (PtdIns) an seiner dritten Position zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns-3-P), Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns-3,4-P) sowie Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PtdIns-3,4,5-P), welche Mediatoren der von PI3-Kinasen abhängigen Signalwege sind ¹²⁹. Tyrosinkinase ¹³⁰ und G-Proteingekoppelte Rezeptoren ¹³¹ aktivieren PI3-Kinasen *in vivo*.

Es werden drei Klassen der heterodimeren PI3-Kinasen differenziert, die sich in ihrer Substratspezifität und Zusammensetzung unterscheiden. Klasse I PI3-Kinasen scheinen *in vivo* PtdIns-4,5-P als Substrat zu bevorzugen und Hauptlieferant des signalmodulatorisch wirksamen PtdIns-3,4,5-P zu sein. Zur Klasse der IA PI3-Kinasen zählen die katalytischen Isoformen p110 α , β und δ sowie sieben verschiedene regulatorische Untereinheiten. Katalytische Isoform der Klasse IB PI3-Kinasen ist p110 γ . Die p110-Isoformen α und β kommen ubiquitär in fast allen Geweben vor. p110 δ und γ scheinen dagegen weitgehend auf Zellen des lymphatischen Systems beschränkt, wenngleich p110 γ Aktivität auch in der Rattenleber gefunden wurde ⁴⁷.

Dagegen setzen Klasse III PI3-Kinasen ausschließlich PtdIns um und werden für die Bildung des Großteils von intrazellulärem PtdIns-3-P verantwortlich gemacht. Da die intrazelluläre Konzentration von PtdIns-3-P auch unter Stimulation relativ konstant bleibt, wird den Klasse III PI3-Kinasen eine eher untergeordnete Rolle für die Übermittlung von Zellsignalen zugesprochen. Die Bedeutung von Klasse II PI3-Kinasen *in vivo* ist weiter unklar, auch wenn *in vitro* ebenfalls eine Präferenz für PtdIns gezeigt wurde ¹³².

Von den vielen der von PI3-Kinasen abhängigen Signalwegen sollen hier einige exemplarisch genannt werden:

- Über die Aktivierung von Phosphatidylinositol-abhängiger Kinase 1 (PKB, auch Akt) wird neben anderen die Proteinkinase B (PKB, auch Akt) aktiviert, die der am besten charakterisierte Effektor der PI3-Kinasen ist ¹³³ und unter anderem Überlebenssignale vermittelt ¹³⁴.
- Auch Proteinkinase C-Isoformen, darunter ϵ , λ und ζ , sind Effektoren der PI3-Kinasen und vermitteln zum Teil Gallensäuren-induzierte Signale ^{37, 62, 63}.
- Durch Aktivierung von NF κ B modulieren PI3-Kinasen auch die Genexpression und beeinflussen so das Zellwachstum ³⁷.

- Die Aktivierung von MAPK kann über MEK durch PI3-Kinasen Akt- und PKC ξ -abhängig reguliert werden. Daneben führt eine 1998 erstmals nachgewiesene PtdIns-unabhängige Seronin/Tyrosin-Proteinkinaseaktivität der PI3-Kinasen zu einer direkten Aktivierung von MAPK ¹³⁵.
- In Leberzellen modulieren PI3-Kinasen darüber hinaus die Aktivität kanalikulärer Transportproteine ¹³⁶, spielen eine wichtige Rolle für den transzellulären Vesikeltransport und haben Einfluss auf für Sekretionsprozesse verantwortliche Zytoskelettstrukturen ^{137, 138}, wobei hier dem Produkt der Klasse I PI3-Kinasen PtdIns-3,4,5-P eine besondere Bedeutung bei Exozytose- und Endozytoseprozessen zuzukommen scheint ¹³⁹.

1.1.3.2 Bedeutung der Klasse I PI3-Kinasen in der Signalgebung von Gallensäuren

Trotz der konträren Wirkungen verschiedener Gallensäuren auf Lebergewebe wurden PI3-Kinasen als Schlüsselenzyme der Signalwege sowohl cholestatisch wie auch choloretisch wirksamer Gallensäuren identifiziert.

So wurde von Beuers *et al.* gezeigt, dass die von der hydrophoben Gallensäure TLCA induzierte Cholestase in isoliert perfundierten Rattenlebern (s. **Kap. 1.1.1.2**) durch den PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin aufgehoben werden kann. In derselben Arbeit erwies sich auch die durch TLCA induzierte Hemmung der Sekretion von Gallensäuren in Pseudokanaliculi isolierter Rattenhepatozytencouplets als von PI3-Kinasen abhängig. In beiden Modellen wurde auch eine Aktivierung von PI3-Kinasen durch TLCA belegt ⁵⁰. Die ebenfalls hydrophobe, aber weniger cholestatisch wirksame Gallensäure GCDCA ist ebenfalls in der Lage, PI3-Kinasen zu stimulieren und löst in isoliert perfundierten Rattenlebern PI3-Kinasen-abhängig Apoptose aus ⁴⁰. Auch die hydrophilere Gallensäure TCA aktiviert PI3-Kinasen ^{47, 140} und entfaltet ihre choloretische Wirkung in isoliert perfundierten Rattenlebern durch PI3-Kinasen vermittelt ¹⁴⁰.

Ähnliches wurde für die anticholestatisch wirksame TUDCA beschrieben, die in primären Rattenhepatozyten ebenfalls PI3-Kinasen zu aktivieren scheint. Ihre choloretische, die Gallensäuresekretion stimulierende Wirkung in isoliert

perfundierten Rattenlebern erwies sich als PI3-Kinasen-abhängig ¹⁴¹, wohingegen ihr anticholestatischer Effekt PI3-Kinasen-unabhängig vermittelt wird ⁵⁰.

Abbildung 7 fasst vereinfachend die zentrale Rolle der PI3-Kinasen in den gegensätzlichen Effekten von Gallensäuren im Lebergewebe zusammen. Als mögliche Erklärungen, wie ein Enzym derart konträre Signale vermitteln kann („PI3-Kinase-Paradoxon“), wurden in der Vergangenheit diskutiert:

- 1) Aktivierung der PI3-Kinasen in unterschiedlicher zeitlicher Folge zum Gallensäurenstimulus: bei Untersuchungen an primären Rattenhepatozyten zeigte sich, dass die Aktivierung von PI3-Kinasen durch TUDCA nur transient bis zu 30 min nach Stimulation auftrat, die durch TLCA jedoch anhaltend über 60 min hinaus war ⁵⁰. Ein Einfluss dieser unterschiedlichen zeitlichen Verläufe der PI3-Kinasen-Aktivität auf die zelluläre Antwort scheint denkbar.
- 2) Aktivierung von PI3-Kinasen in unterschiedlichen Zellkompartimenten: da die Produkte der PI3-Kinasen inhomogen in der Zelle verteilt sind ¹³⁹, scheint auch eine heterogene Aktivierung des Enzyms in verschiedenen Zellkompartimenten nahe liegend. Letztere könnte vom aktivierenden Stimulus abhängig sein.
- 3) Aktivierung unterschiedlicher PI3-Kinase-Isoformen: über die unterschiedliche und ggf. konträre Funktion der in Hepatozyten beschriebenen Klasse I PI3-Kinase-Isoformen p110 α , β und γ ist bisher wenig bekannt. Selektive Aktivierung bestimmter PI3-Kinase-Isoformen mit eventuell unterschiedlichen “down-stream“ Effektoren könnte die konträren Wirkungen verschiedener Gallensäuren vermitteln.

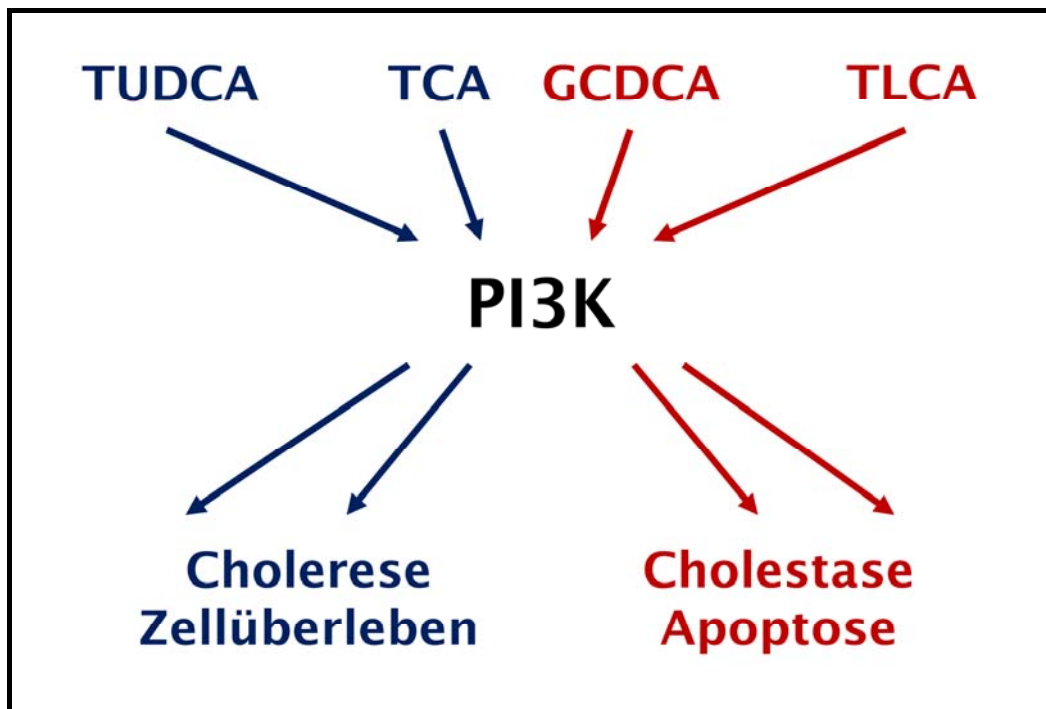


Abbildung 7: Zentrale Stellung der PI3-Kinasen in Gallensäuren-induzierten Signalen: das „PI3-Kinase-Paradoxon“

1.2 Fragestellungen der Arbeit

Ursodeoxycholsäure ist sowohl in der Therapie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten als auch in vielen Tier- und Zellmodellen der Cholestase ein potentes anticholestatisches Agens (s. **Kap. 1.1.2**). Die dieser Wirkung zugrunde liegenden Mechanismen und die dafür verantwortlichen intrazellulären Signalwege sind jedoch bisher nur unzureichend aufgeklärt. Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Effekte des Taurinkonjugates von UDCA, TUDCA in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen der Cholestase und versucht, weitere an dem anticholestatischen Effekt von TUDCA beteiligte intrazelluläre Signalmediatoren zu identifizieren.

1.2.1 Beeinflussen Gallensäuren den Einbau von Transportproteinen in die apikale Membran von HepG2-Zellen?

Gallensäuren modulieren die hepatozelluläre Sekretionskapazität entscheidend durch die Modulation der Zahl aktiver Transportproteine an der Zellmembran der Hepatozyten (s. **Kap. 1.1.2.1** und **1.1.2.2**). Mit Hilfe Ntcp-transfizierter HepG2-Zellen soll ein Modell für diese Regulationsvorgänge etabliert werden, um die zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege zu entschlüsseln. Es werden die Effekte von TLCA, TUDCA, der Kombination beider Gallensäuren sowie von cAMP auf die membranäre Dichte der Konjugatexportpumpe MRP2 in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen untersucht. cAMP dient dabei als Positivkontrolle, nachdem gezeigt wurde, dass es in primären Rattenhepatozyten eine Translokation von Mrp2 an die Hepatozytenmembran induziert⁶⁹.

1.2.2 Vermitteln Isoformen der Proteinkinase C (PKC) und A (PKA) den anticholestatischen Effekt der TUDCA in Leberzellen?

Die α -Isoform der PKC wurde in der Vergangenheit als ein Schlüsselenzym für die Vermittlung TUDCA-induzierter Signale in Hepatozyten diskutiert, wenngleich diese Hypothese umstritten ist (s. **Kap. 1.1.2.3**). PKA spielt eine wichtige Rolle für die

sekretorische Funktion in verschiedenen Zelltypen, wurde aber bisher kaum mit den anticholestatischen Effekten der TUDCA in Verbindung gebracht. Die Rolle dieser beiden möglichen Signalmediatoren wird *in vivo* und *in vitro* untersucht.

1.2.2.1 Bedeutung von cPKC α und PKA für den anticholestatischen Effekt der TUDCA in der isoliert perfundierten Rattenleber

Im *in vivo* Modell der TLCA-induzierten Cholestase in isoliert perfundierten Rattenlebern werden die anticholestatische Wirkung der hydrophilen Gallensäure TUDCA und deren Modulation durch Einsatz von Inhibitoren der cPKC-Isoformen (Staurosporin), spezifisch der cPKC α (Gö6976) sowie der PKA (H89) untersucht. Als Zielparameter werden dabei dargestellt: quantitativer Gallenfluß, biliäre Sekretion des Modellsubstrats der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2, GS-DNP als Parameter der hepatobiliären Transportkapazität sowie die hepatovenöse Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) als Indikator für das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung.

1.2.2.2 Bedeutung von cPKC α und PKA für den anticholestatischen Effekt der TCA in der isoliert perfundierten Rattenleber

Auch die hydrophile Gallensäure TCA wirkt in verschiedenen experimentellen Modellen der Cholestase anticholestatisch. Um zu untersuchen, ob die im Rahmen dieser Arbeit entschlüsselten intrazellulären Signalwege der TUDCA spezifisch für diese Gallensäure oder den hydrophilen Gallensäuren gemeinsam sind, werden in der isoliert perfundierten Rattenleber auch die Effekte der TCA und deren Modulation durch die Enzyminhibitoren Staurosporin und H89 untersucht. Die Zielparameter sind dabei identisch mit den für die TUDCA genannten (s. **Kap. 1.2.2.1**).

1.2.2.3 Phosphorylierung der Konjugatexportpumpe MRP2 *in vitro* durch von Gallensäuren aktivierte Proteinkinasen

Phosphorylierung von Transportproteinen kann, wie in Zellmodellen gezeigt, deren Membraninsertion regulieren und in einer gesteigerten Transportkapazität resultieren^{99, 142} (s. **Kap. 1.1.2.1**). Da cPKC α durch TUDCA aktiviert wird, könnte dieser Effekt auch durch Gallensäuren induziert auftreten. In einem einfachen *in vitro* Ansatz wird daher untersucht, ob die potentiellen TUDCA-Effektoren cPKC α und PKA oder der TLCA-Effektor nPKC ϵ humanes MRP2 phosphorylieren.

1.2.3 Haben Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) eine Bedeutung für den anticholestatischen Effekt der TUDCA in der isoliert perfundierten Rattenleber?

Verschiedene Vertreter der Gruppe der MAPK wurden in einer Reihe von Untersuchungen für die choleretischen Effekte der TUDCA in nicht-cholestatischen Hepatozyten verantwortlich gemacht (s. **Kap. 1.1.2.3**). Diese Arbeit möchte der Frage nachgehen, ob diese Signalwege auch zum anticholestatischen Effekt der TUDCA unter TLCA-induzierter Cholestase beitragen können. Analog zu den Untersuchungen zur Bedeutung der cPKC α und PKA (s. **Kap. 1.2.2.1**) werden daher im *in vivo* Modell der TLCA-induzierten Cholestase Effekte der TUDCA und deren Modulation durch Einsatz des p38^{MAPK}-Inhibitors SB 202 190 und des Erk1/Erk2-Inhibitors PD 98 095 untersucht. Die Zielparameter sind dabei wiederum identisch mit den oben genannten (s. **Kap. 1.2.2.1**).

1.2.4 Vermitteln Gallensäuren Ihre biologischen Effekte durch selektive Aktivierung von Isoformen der PI3-Kinase?

1.2.4.1 Aktivierung von Isoformen der PI3-Kinase durch Gallensäuren

PI3-Kinasen der Klasse I wurden für die konträren Wirkungen sowohl der cholestatischen und Apoptose-induzierenden hydrophoben Gallensäuren als auch der choloretisch und antiapoptotisch wirksamen, hydrophilen Gallensäuren verantwortlich gemacht (s. **Kap. 1.1.3**). Diese Arbeit geht der Frage nach, ob für diese konträren Wirkungen die selektive Aktivierung verschiedener Isoformen der katalytischen p110-Untereinheit der PI3-Kinasen α , β oder γ durch die unterschiedlichen Gallensäuren verantwortlich sein könnte. In primären Rattenhepatozyten wird in einem isoformspezifischen radioaktiven Kinaseassay die Aktivität der genannten p110 PI3-Kinase-Isoformen nach Stimulation mit den hydrophoben Gallensäuren TLCA und GCDCA und den hydrophilen Gallensäuren TCA und TUDCA bestimmt.

1.2.4.2 Bedeutung der PI3K-Isoform p110 γ für Gallensäuren-induzierte Apoptose

Hydrophobe Gallensäuren wie TLCA, TCDCA und GCDCA können in intakten Lebern wie in Kulturen von Leberzellen Induktoren des programmierten Zelltodes sein (s. **Kap. 1.1.1.2 und 1.1.3**)^{2, 40}. Die der Apoptose-induzierenden Wirkung dieser Gallensäuren zugrunde liegenden Signalwege waren und sind Gegenstand vielzähliger Untersuchungen, wobei Enzymen der Gruppe der PI3-Kinasen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Zelltod und -überleben zugesprochen wurde (s. **Kap. 1.1.3**)^{2, 37, 40, 50, 143, 144}. Die Untersuchungen zur Fragestellung **1.2.4.1** bestätigten, dass sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gallensäuren PI3-Kinasen aktivieren, die PI3-Kinase-Isoform p110 γ jedoch wurde nur von den hydrophoben, Apoptose-auslösenden Gallensäuren TLCA und GCDCA aktiviert. Wir untersuchten daher in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 die Bedeutung der PI3-Kinase-Isoform p110 γ als Mediator der Gallensäuren-induzierten Apoptose. Dafür wurde die

Isoform der PI3-Kinasen p110 γ sowohl pharmakologisch gehemmt als auch durch Transfektion mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ herunterreguliert und der Effekt dieser Behandlung auf Gallensäuren-induzierte Apoptose untersucht.

2 METHODIK

2.1 Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber ist ein etabliertes System zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in der intakten Leber, wie in **Kap. 1.1.1.2** und in früheren Arbeiten beschrieben^{2, 46}.

2.1.1 Technik der isolierten Rattenleberperfusion

Präparation der Leber

Die gründliche Anästhesie der Ratten erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos). In der linken Leistenregion wurde die große Inguinalvene punktiert und 0,1 ml Heparin (Heparin-Natrium Braun 25.000 I.E./ml, Braun, Melsungen) im Bolus injiziert.

Die Bauchdecke wurde bis zum Processus xiphoideus hin mittels Medianschnitt eröffnet und der Schnitt im Unterbauchbereich beidseitig nach lateral erweitert. Die Baucheingeweide wurden nach links verlagert, um besseren Zugang zur Leberpforte zu erlangen. Anschließend erfolgte die Anlage eines Ligaturfadens aus Baumwolle um die Vena cava inferior oberhalb des Zuflusses der rechten Vena renalis. Es folgte die Vorbereitung zweier Ligaturen der Vena portae in ihrem pankreatoduodenalen Anteil, woraufhin die Pfortader distal der Ligaturstellen mit einer Mikroschere eröffnet und mit einer 16G-Venenverweilkanüle (Insyte-W® von Becton Dickinson, Sandy, Ut., USA) kanüliert wurde. Zur Fixierung wurden die beiden Ligaturen zugezogen und verknotet. Das Einführen der Kanüle, die über einen Kunststoffschlauch für den Zustrom der Perfusionslösung sorgte (**s. Abbildung 8**), markierte den Beginn der isolierten Leberperfusion und damit den Start der Zeitmessung der Versuche. Zur Vermeidung einer Drucküberlastung der Leber und zur Sicherstellung eines ungehinderten Abflusses des Perfusionsmediums wurde unmittelbar nach Einbringen der Kanüle die Vena cava inferior eröffnet. Danach wurde mittels Thorakotomie das

Herz freigelegt und zwei Ligaturfäden am intrathorakalen Teil der Vena cava inferior angelegt. Nach Eröffnung des rechten Vorhofs ließ sich eine 16 G-Venenverweilkanüle retrograd in die Vena cava inferior einführen und durch die beiden Ligaturen sichern. Ein Kunststoffschlauch stellte den kontrollierten Abfluss des Perfusats sicher. Daraufhin wurde der Gallengang dargestellt, stumpf freipräpariert und nach Eröffnung mittels Mikroschere mit einem Polyethylenschlauch (Innendurchmesser 0,40 mm, Außendurchmesser 0,80 mm, SIMS Portex Ltd., Hythe, Kent, Großbritannien) kanüliert. Auch dieser wurde mit einer Ligatur gesichert und so positioniert, dass ein ungehinderter Abfluss der Galle gewährleistet war. Nach abschließender Ligatur der eröffneten infrahepatischen Vena cava erfolgte die Drainage des Perfusats exklusiv über die Kanüle im intrathorakalen Teil der unteren Hohlvene. Anschließend wurde die Leber mit einer mit 0,9%iger NaCl-Lösung befeuchteten Kompresse abgedeckt, um ein Austrocknen der Leberoberfläche zu verhindern.²

Perfusionsablauf

Als Perfusionsmedium diente Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (118 mmol/l NaCl, 4,8 mmol/l KCl, 25 mmol/l NaHCO₃, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 1,2 mmol/l MgSO₄, 1,9 mmol/l CaCl₂, 5,5 mmol/l D-Glucose; pH 7,4). Der Puffer wurde mittels einer Schlauchpumpe (MS-1 Reglo 160/6, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld) in konstanter Geschwindigkeit gefördert, um eine Zielperfusionsrate von 40 ml/min zu erreichen. In einem Oxygenator (Laborwerkstätte Klinikum Großhadern, München) wurde das Medium mit Carbogen® (95 % O₂, 5 % CO₂, Linde, Höllriegelskreuth) begast und über ein angeschlossenes Wasserbad auf 37°C erwärmt. Eine der portalen Perfusionskanüle vorgeschaltete Blasenfalle verhinderte das Eindringen von Luftbläschen in die Pfortader. Eine dem zuführenden Schlauch parallel geschaltete Glasröhre erlaubte die kontinuierliche Messung des portalvenösen Drucks (in cm Wassersäule). Mit Hilfe von Perfusorpumpen (Perfusor®, Braun, Melsungen) konnte über ein Mehrwegehahnssystem je nach Versuchsbedingung die Zufuhr von Gallensäuren, Inhibitoren oder deren Trägerlösungen erfolgen. Im Verlauf des Versuchs wurde das Perfusionsmedium für 10 min auf 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol-haltigen (CDNB, 30 µmol/l) Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer umgestellt. CDNB wird in der Leber an Glutathion gebunden und das entstehende GS-DNP als Modellanion des apikalen

Anionentransporters Mrp2 in die Galle sezerniert, aus der es spektralphotometrisch quantifiziert werden kann. Diese Methode erlaubte eine Aussage über die sekretorische Kapazität der Leber für Organische Anionen (s. **Kap. 2.1.2**).

Mit Beginn der 16. Minute der Perfusion wurde die aus der Gallengangskanüle austretende Gallenflüssigkeit in vorgewogenen Eppendorf-Cups über jeweils 5 min gesammelt und gravimetrisch quantifiziert, wofür vereinfachend ein spezifisches Gewicht der Gallenflüssigkeit von 1,0 g/ml angenommen wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Perfusionen wurde der so bestimmte Gallenfluß jeweils in Mikrolitern Gallenflüssigkeit pro Gramm Lebergewicht und Minute ($\mu\text{l/g}$ Leber/min) dargestellt.

Je nach Versuchsprotokoll wurden zu drei bestimmten Zeitpunkten außerdem Proben des Perfusats aus dem venösen Abfluss der Leber gesammelt und auf Eis gelagert. Hieraus erfolgte die Bestimmung der Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), um eine Aussage über den Grad der Leberzellschädigung und deren Entwicklung über die Zeit machen zu können. Außerdem wurde in einigen der Versuche in diesen Proben die Konzentration von GS-DNP gemessen um Aufschluss über die basale Sekretion organischer Anionen zu erhalten.

Am Ende des Versuchs wurde der anteriore Leberlappen exzidiert und gewogen. Eine ca. 200 mg schwere Probe wurde augenblicklich in eiskaltem Lysepuffer (20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 2,5 mmol/l Na_2PO_4 , 1 mmol/l Glycerolphosphat, 200 mmol/l PMSF, 100 mmol/l Na_3VO_4 , 500 μM Okadaic acid, 5 g/l Aprotinin, 23,8 g/l Leupeptin; pH 7,5) lysiert und mehrere Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Diese Gewebeproben dienten für spätere molekularbiologische Untersuchungen (s. **Kap. 2.1.5**). Die Restleber wurde entnommen und nach dem Abwiegen verworfen. ²

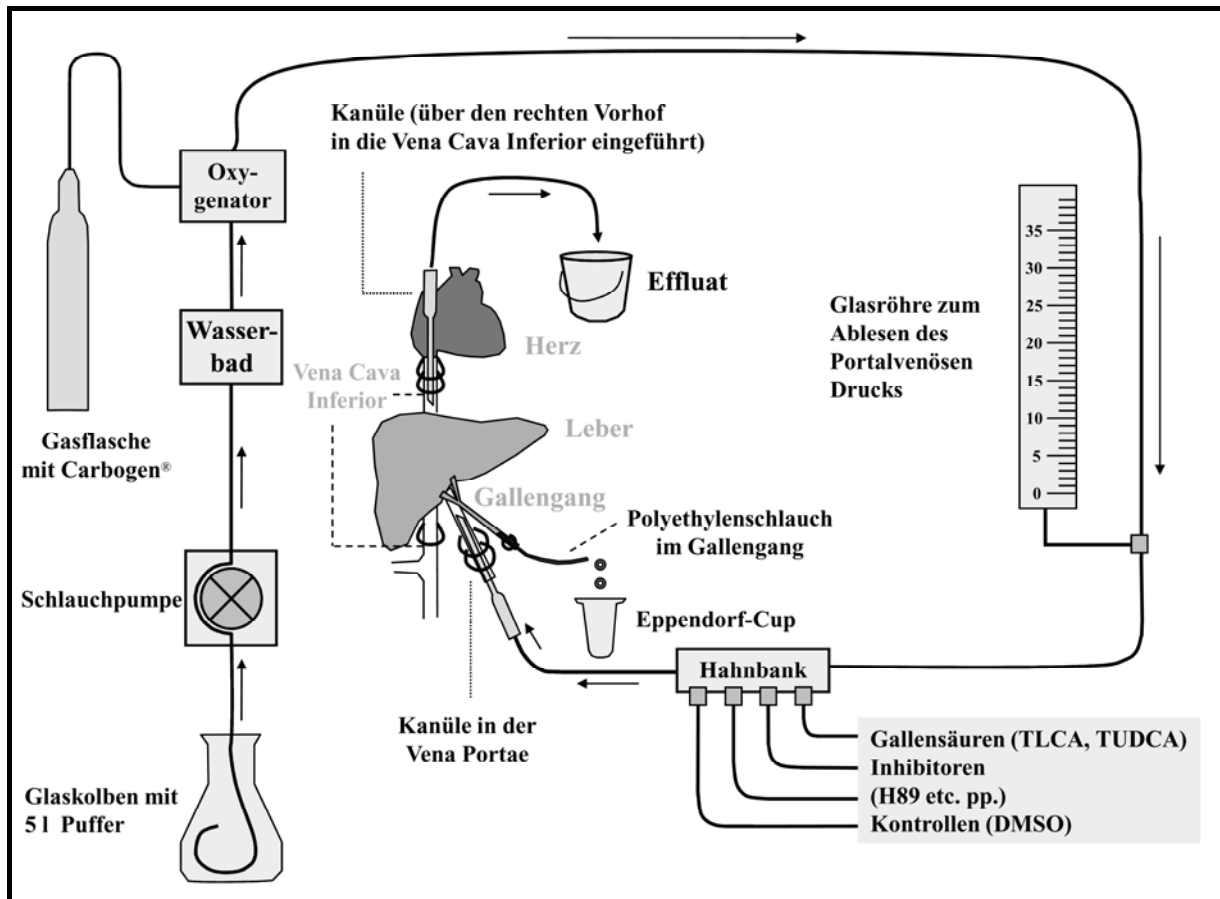


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Perfusionsanlage (nach ²⁾)

2.1.2 Biläre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP

Das Multidrug-Resistenz-assoziierte-Protein 2 (Mrp2) ist ein vornehmlich apikal aktives Transportprotein des Hepatozyten und dient der Sekretion organischer Anionen (s. **Kap. 1.1.1.3**). Um die Mrp2-assoziierte sekretorische Kapazität der Leber während der Perfusionsexperimente erfassen und quantifizieren zu können, wurde für 10 min 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) infundiert. CDNB wird unter Abspaltung von HCl als Thioether an Glutathion gebunden, über Mrp2 ausgeschieden und ist in der gesammelten Galle als 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion (GS-DNP) spektrophotometrisch messbar. Die Menge an sezerniertem GS-DNP korreliert dabei gut mit der sekretorischen Kapazität der Leber für Organische Anionen und damit auch mit der Anzahl und Aktivität von Mrp2 Transportern an der apikalen Membran. Bei der eingesetzten Konzentration von 30 μM CDNB wird dabei eine Sättigung der Transportkapazität der perfundierten Rattenleber erreicht ⁴⁹.

Messung des Mrp2-Substrats GS-DNP in der Galle

Von jeder Gallenprobe wurden 5 µl (bei geringerer vorhandener Probenmenge weniger) in 1000 µl Aqua bidest verdünnt. Die Extinktion wurde in einer PS-Halbmikro-Einmalküvette gegen Aqua bidest als Referenzprobe bei 335 nm im Photometer gemessen. Die Konzentration (c) wurde über folgende Formel bestimmt:

$$c = \frac{E_{335} \cdot V_{\text{ges}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}}$$

E: Extinktion

ε: molarer Extinktionskoeffizient (l/(nmol x cm)); hier: ε (335 nm) = 9,6 l/(nmol x cm)

d: Schichtdicke; hier: 1 cm

V_{Probe}: Volumen der Probe

V_{ges}: Gesamtvolumen in der Küvette

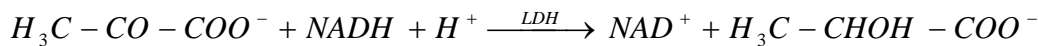
Da Galle bei 335 nm eine Eigenabsorption besitzt, mussten die Extinktionswerte entsprechend korrigiert werden. Der Extinktionswert der letzten Gallenprobe vor CDNB-Zugabe galt als Nullpunkt und wurde von den anderen Extinktionswerten abgezogen.

2.1.3 Aktivität der LDH im hepatovenösen Effluat

Die Laktatdehydrogenase (LDH) befindet sich als Enzym der Glykolyse im zytosolischen Kompartiment der Zelle. Kommt es zu gravierender Zellschädigung mit Verlust der Membranintegrität, erfolgt konsekutiv die Abgabe von zytosolischen Enzymen in das umgebende Medium. Eine photometrische Bestimmung der LDH-Aktivität im hepatovenösen Effluat gibt daher Aufschluss über das Ausmaß des Leberzellschadens unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen.³⁶

Hintergrund

In Anwesenheit von LDH wird Pyruvat durch NADH/H⁺ zu Laktat reduziert, gleichzeitig entsteht NAD⁺, wie hier dargestellt:



NADH absorbiert UV-Strahlung bei 339 nm, die oxidierte Form NAD⁺ jedoch nicht. Somit kann aus der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit der Stoffmengenumsatz und damit die Enzymaktivität in µmol/min (1 µmol/min entspricht 1 U) bestimmt werden.

Durchführung

Es wurde ein Standardtest ¹⁴⁶ unter Zugabe von 500 µl Effluat und 10 µl NADH-Lösung (10 mg/ml) zu 500 µl 0,60 mmol/l Pyruvatpuffer verwendet. Bei einer Wellenlänge von 339 nm wurde die Extinktion 1, 2, 3 und 4 min nach dem Start der Reaktion gemessen.

Die Volumenaktivität (z) der LDH im hepatovenösen Effluat wurde aus diesen Ergebnissen nach folgender Formel berechnet:

$$z = \frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta c \cdot V}{\Delta t} = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot \Delta t}$$

$$z_{Probe} = \frac{\Delta E \cdot V_{ges}}{\varepsilon \cdot d \cdot \Delta t \cdot V_{Probe}}$$

ΔE: Extinktionsänderung

ε: molarer Extinktionskoeffizient (l/(mmol x cm)); hier: ε (339 nm) = 6,3 l/(mmol x cm)

d: Lichtweg; hier: 1 cm

Δt: Messabstand (min)

V_{ges}: Volumen des gesamten Testansatzes in der Küvette

V_{Probe}: Volumen der Probe

Puffer-Lösungen

Pyruvatpuffer: 66,6 mg Natriumpyruvat *ad* 1000 ml 50 mmol/l Phosphatpuffer
(8,71 g K₂HPO₄, 6,80 g KH₂PO₄ *ad* 1000 ml Aqua bidest)

NADH-Lösung: 10 mg NADH-Na₂ *ad* 1 ml 0,5 % NaHCO₃-Lösung (10 mg/ml).

2.1.4 Versuchsprotokolle

2.1.4.1 Versuchsprotokoll I für PKC/PKA-Versuchsreihe

Das Versuchsprotokoll für die Versuche zur Rolle der cPKC α und PKA für die anticholestatische Wirkung der TUDCA ist in **Abbildung 9** gezeigt.

Ab der 21. min erfolgte je nach Versuchsvariante die Zugabe des PKC-Inhibitors Gö6976 (100 nmol/l), des PKA-Inhibitors H89 (100 nmol/l), des PKC/PKA-Inhibitors Staurosporin (ST, 10 nmol/l) oder von Kombinationen dieser Inhibitoren bzw. zur Kontrolle deren Trägersubstanz DMSO (0,001 %). Von der 41. min an wurden zusätzlich die Gallensäuren TLCA (10 μ mol/l), TUDCA (25 μ mol/l) oder TCA (25 μ mol/l) alleine oder in Kombination bzw. die Trägersubstanz DMSO (0,001 %) appliziert. **Tabelle 1** zeigt die somit untersuchten Bedingungen. Von der 65. bis zur 75. min erfolgte die zusätzliche Infusion des organischen Modellions CDNB (30 μ mol/l) zur Abschätzung der Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 (siehe **Kap. 2.1.2**). Perfusat aus dem venösen Abfluss der Leber wurde jeweils zur 25., 55., 85. und 115. Minute gesammelt.

Nach 115 Minuten wurde das Experiment beendet. **Abbildung 9** stellt den zeitlichen Verlauf der Versuche dar, **Tabelle 1** zeigt die getesteten Versuchsvarianten.

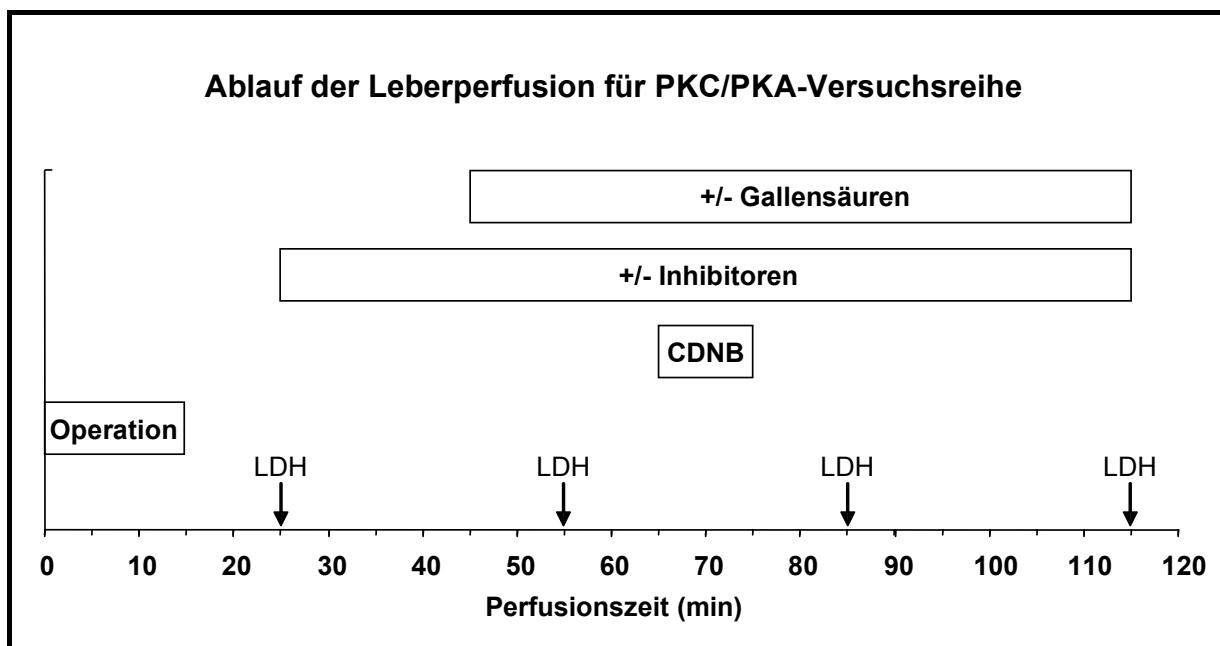


Abbildung 9: Versuchsprotokoll I für PKC/PKA-Versuchsreihe

Gruppe	Gallensäure	Inhibitor
A 1	DMSO	DMSO
A 2	DMSO	ST + H89
B 1	TLCA	DMSO
B 2	TLCA	ST + H89
C 1	TLCA + TUDCA	DMSO
C 2	TLCA + TUDCA	ST + H89
C 3	TLCA + TUDCA	Gö6976 + H89
C 4	TLCA + TUDCA	Gö6976
C 5	TLCA + TUDCA	ST
C 6	TLCA + TUDCA	H89
D 1	TLCA + TCA	DMSO
D 2	TLCA + TCA	ST + H89
E 1	TUDCA	DMSO
E 2	TUDCA	ST + H89

Tabelle 1: Versuchsvarianten der PKC/PKA-Versuchsreihe

2.1.4.2 Versuchsprotokoll II für MAPK-Versuchsreihe

Das Versuchsprotokoll für die Versuche zur Rolle der MAPK p38 und Erk1/2 für die anticholestatische Wirkung der TUDCA ist in **Abbildung 10** gezeigt.

Ab der 21. min erfolgte je nach Versuchsvariante die Zugabe des p38^{MAPK}-Inhibitors SB 202 190 (100 nmol/l oder 500 nmol/l) bzw. als Kontrolle seines inaktiven Analogons SB 202 474 (100 nmol/l oder 500 nmol/l) oder des MEKK-Inhibitors PD 98 059 (500 nmol/l) bzw. als Kontrolle dessen Trägersubstanz DMSO (0,05 %). Von der 41. min an wurden zusätzlich die Gallensäuren TLCA (10 µmol/l) bzw. TUDCA (25 µmol/l) bzw. die Trägersubstanz DMSO alleine oder in Kombination appliziert. Tabelle 2 zeigt die somit untersuchten Bedingungen. Von der 50. bis zur 60. min erfolgte die zusätzliche Infusion des organischen Modellanions CDNB (30 µmol/l) zur Abschätzung der Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 (s. **Kap. 2.1.2**). Perfusat aus dem venösen Abfluss der Leber wurde jeweils zur 45., 65., und 85. Minute gesammelt. Nach 100 Minuten wurde das Experiment beendet.

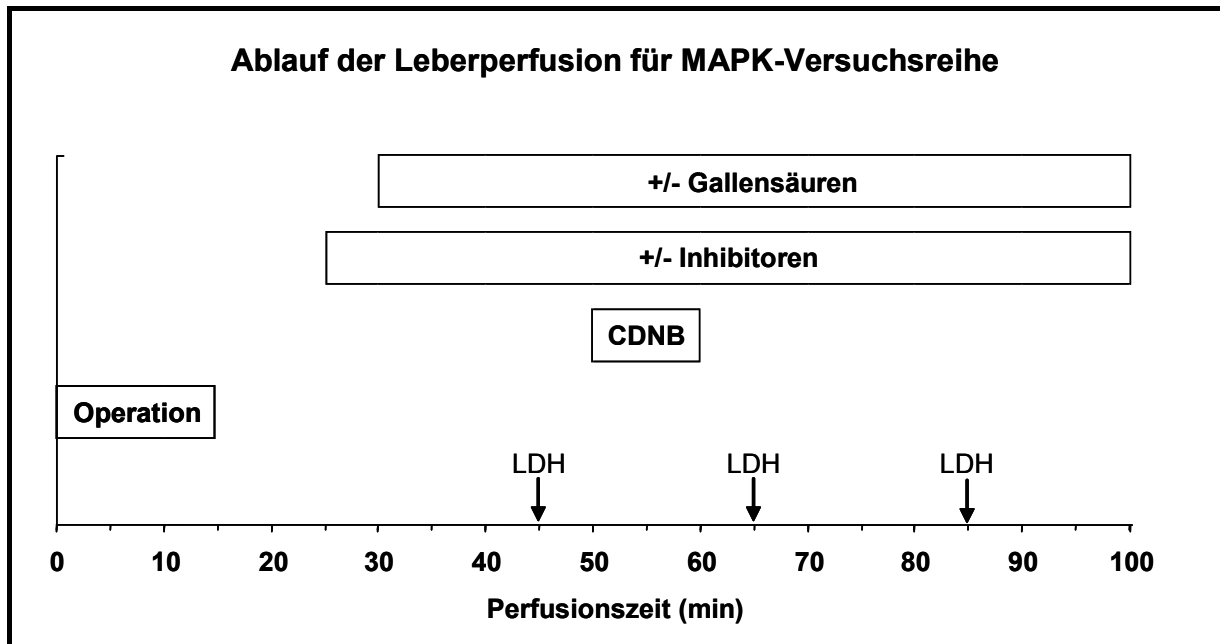


Abbildung 10: Versuchsprotokoll II für MAPK-Versuchsreihe

Gruppe	Gallensäure	Inhibitor
a 1	DMSO	DMSO
a 2	DMSO	PD 98 059
a 3	DMSO	SB 202 474
a 4	DMSO	SB 202 190
b 1	TLCA	DMSO
b 2	TLCA	PD 98 059
b 3	TLCA	SB 202 474
b 4	TLCA	SB 202 190
c 1	TLCA + TUDCA	DMSO
c 2	TLCA + TUDCA	PD 98 059
c 3	TLCA + TUDCA	SB 202 474
c 4	TLCA + TUDCA	SB 202 190
c 5	TLCA + TUDCA	<i>SB 202 474 (500 nmol/l)</i>
c 6	TLCA + TUDCA	<i>SB 202 190 (500 nmol/l)</i>
c 7	TLCA + TUDCA	SB 202 190 + PD 98 059
d 1	TUDCA	DMSO
d 2	TUDCA	PD 98 059
d 3	TUDCA	SB 202 474
d 4	TUDCA	SB 202 190

Tabelle 2: Versuchsvarianten der MAPK-Versuchsreihe

2.1.5 Molekular- und zellbiologische Untersuchungen im Lebergewebe

Die Rattenlebern aller Perfusionsversuche wurden nach Abschluss der Perfusion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (s. **Kap.2.1.1**) und waren für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen verfügbar.

2.1.5.1 Bestimmung von cAMP per Enzymimmunoassay (EIA)

In Lebergewebe der Versuche zur Bedeutung der cPKC α und PKA für den anticholestatischen Effekt der TUDCA (Versuchsprotokoll I) wurde die Konzentration des second messengers cAMP als Maß für die Aktivierung des PKA-Signalwegs bestimmt. Nach Extraktion des cAMP aus dem Lebergewebe kam dazu der kommerziell erhältliche EIA „cAMP Direct Biotrak™ EIA“ (Amersham) zur Anwendung.

Hintergrund

In den Vertiefungen der 96-well Platten dieses Kits sind Esel-anti-Kaninchen Antikörper vorgebunden. Der zur Durchführung des Assays in die Vertiefungen eingebrachte Erstantikörper Kaninchen-anti-cAMP bindet cAMP aus den aufgebrauchten Proben. Es folgt die Zugabe eines cAMP-Peroxidase Konjugats, welches das zu messende cAMP konzentrationsabhängig aus der Bindung mit dem Antikörper verdrängt und das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin umsetzt, wodurch es zu einem photometrisch erfassbaren Farbumschlag kommt, der mit der in den Proben vorhandenen cAMP-Konzentration korreliert.

Durchführung

Je Versuch wurden 75 mg tiefgefrorenes Lebergewebe in 750 μl eiskalter 6%iger Trichloressigsäure für 20s mit dem Sonifier lysiert und das Lysat anschließend für 15 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde viermal mit 3 ml wassergesättigtem Diethylether ausgeschüttelt, wobei die obere Phase jeweils verworfen wurde. Das so gereinigte Extrakt wurde bei 60°C im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 1 ml „Assay Buffer“ des kommerziellen Kits gelöst.

Zur Durchführung des EIA wurden in die Vertiefungen der 96-well Platte des Kits zunächst je 100 µl 1:10 mit Assay Buffer verdünnte Probe und 100 µl Antiserum (Kaninchen-anti-cAMP) einpipettiert und bei 500 Umdrehungen/min mit dem Kreisschüttler für 180 min bei 3-5°C inkubiert. Nach den ersten 120 min der Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 µl Peroxidase-konjugiertem cAMP. Nach viermaligem Waschen der Vertiefungen mit je 400 µl Waschpuffer startete die Nachweisreaktion durch Zugabe von 150 µl Substrat-Lösung je Vertiefung. Nach 60 min Inkubation bei RT und 500 Umdrehungen/min mit dem Kreisschüttler wurde die Reaktion mit 100 µl 2N Schwefelsäure gestoppt und die Absorption von Licht bei 450 nm Wellenlänge in einem Plattenphotometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Dank einer im Kit integrierten Standardkurve ließen sich die Ergebnisse quantitativ in pmol cAMP pro g Lebergewebe ausdrücken.

2.1.5.2 Nachweis von P-CREB im Western Blot

In Lebergewebe der Versuche zur Bedeutung der cPKC α und PKA für den anticholestatischen Effekt der TUDCA (Versuchsprotokoll I) wurde der Phosphorylierungsgrad des PKA-Substrats „cAMP response element-binding protein“ (CREB) als Maß für die PKA-Aktivität bestimmt.

Aus 100 mg tiefgefrorenem Lebergewebe wurden in einem Dounce-Homogenisator mit 1 ml SDS-Harnstoff-Tris-Puffer (2 % SDS, 6 mol/l Harnstoff, 0,1 mol/l Tris, 0,005 % Bromphenolblau, 5 % 2-Mercaptoethanol, 1 mmol/l PMSF) Zelllysate hergestellt, welche für 5 Sekunden bei 10 W mit dem Ultraschallhomogenisator weiter homogenisiert wurden. Nach Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C wurden die Überstände abgehoben, ihr Proteingehalt mit der Methode nach Bradford bestimmt und die Proben mit SDS-Harnstoff-Tris-Puffer auf 1 g/l Proteingehalt verdünnt. Je 10 µl der Probe wurden für 30 min bei RT reduziert, in einer SDS-PAGE in 10 % Polyacrylamidgelen für 60 min bei 150 V aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran transferiert. Die Membranen wurden für 1 h bei RT in Blockierungspuffer (5 g/dl Rinderserumalbumin in TBST: 20 mmol/l Tris, 137 mmol/l NaCl, 0,1 % Tween; pH 7,6) geblockt. Über Nacht erfolgte dann in Blockierungspuffer die Inkubation mit einem Kaninchen-anti-Phospho-CREB Antikörper (Ser133) (Verdünnung 1:2000) und mit einem Maus-anti-GAPDH

Antikörper, um gleichzeitig phosphoryliertes CREB (P-CREB) und mit GAPDH einen Marker für den Gesamtproteingehalt der Proben nachzuweisen. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für 5 min mit TBST schloss sich die Inkubation mit den Zweitantikörpern Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP (Verdünnung 1:20.000) und Ziege-anti-Maus IgG-HRP (Verdünnung 1:200.000) an. Die gebundenen Antikörper wurden mittels Auftrag eines Chemilumineszenz-Reagenz und Exposition gegenüber einem Kodak BiomaxMR Film sichtbar gemacht und die entstehenden Banden densitometrisch ausgewertet.

2.2 *In vitro* Bestimmung der cPKC α -, nPKC ϵ - und PKA-Aktivität

Mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Methode zur *in vitro* Messung der Aktivität verschiedener Proteinkinasen soll die Spezifität und Potenz der in den Perfusionsversuchen verwendeten Inhibitoren getestet werden.

Dazu wurden rekombinant hergestellte cPKC α , nPKC ϵ und PKA mit ihrem Modellsubstrat Myelin Basic Protein (MBP), den jeweiligen Inhibitoren sowie radioaktiv markiertem ATP inkubiert, anschließend die Menge an phosphoryliertem MBP durch Messung des autoradioaktiven Zerfalls bestimmt und daraus Rückschlüsse auf die Hemmung der Enzyme durch die getesteten Inhibitoren gezogen.

Durchführung

Zunächst wurden 62,3 μ l der Reaktionsmixturen für PKC (22,5 mmol/l Tris, 161 mg/l MBP, 32,1 μ g/l PKC α bzw. ϵ in H₂O) bzw. PKA (56 mmol/l Tris, 161 mg/l MBP, 161 mU/l PKA in H₂O) mit 0,7 μ l 10fach konzentrierter Stammlösung der Inhibitoren Staurosporin, Gö6976 oder H89 bzw. mit 0,1 prozentigem DMSO als Kontrolle bzw. H₂O als externem Standard versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 7 μ l ATP-Mix (für PKCs: 10 μ mol/l ATP, 1 μ Ci 32P-ATP, 5 mmol/l MgCl₂, 0,2 mmol/l CaCl₂; für PKA: 10 μ mol/l ATP, 1 μ Ci 32P-ATP, 10 mmol/l MgCl₂) gestartet, so dass für alle drei Enzyme folgende Bedingungen untersucht wurden:

Gruppe	Inhibitor
1	H ₂ O (Standard)
2	0,01 % DMSO (Kontrolle)
3	10 nmol/l ST
4	100 nmol/l Gö6976
5	100 nmol/l H89
6	100 nmol/l H89 + 10 nmol/l ST
7	100 nmol/l Gö6976 + 100 nmol/l H89

Tabelle 3: Versuchsvarianten *in vitro* Aktivität von cPKC α , nPKC ϵ und PKA

Nach Inkubation der Reaktionsansätze für 20 min bei 37°C und Stop der Reaktion durch Zugabe von 70 μ l 2-fach SDS-PAGE-Ladepuffer (0,125 mol/l Tris, 2 mmol/l EGTA, 40 % Glycerin, 10 % 2-Mercaptoethanol, 40 g/l SDS, 0,2 g/l Bromphenolblau in H₂O) wurden Aliquots der acht Proben für 5 min bei 95°C reduziert und einer SDS-PAGE in einem 15% Polyacrylamidgel unterzogen. Als Negativkontrolle wurde eine Probe des Reaktionsmix' mit ATP-Mix, jedoch ohne Proteinkinasen mitinkubiert und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte für 60 min bei 150 V. Der anschließenden Fixierung im Polyacrylamidgel über 15 min durch 12% Trichloressigsäure folgte die Darstellung der Proteine durch Färbung in Coomassie-Lösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blau, 50 % Methanol, 10% Eisessig in H₂O). Durch Auswaschen des überschüssigen Coomassie Blau aus dem Gel mit Entfärbelösung (5 % Methanol, 7 % Eisessig in H₂O) zeigte sich schließlich die singuläre Bande des MBP. Die Banden der Negativkontrolle wie der acht Proben wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit 10 ml Szintillations-Cocktail versetzt und der autoradioaktive Zerfall als Maß für die MBP-Phosphorylierung und damit für die Enzymaktivität im Szintillationsmessgerät (Packard Tri-Carb 2100, Packard Instrument Co., Frankfurt/Main) für 5 min ausgezählt.

2.3 *In vitro* Phosphorylierung von MRP2

Phosphorylierung von plasmamembranständigen Transportproteinen wurde als ein möglicher Mechanismus zur Regulation der hepatozellulären Transportkapazität durch Gallensäuren diskutiert und identifiziert (s. **Kap. 1.2.2.3**). Mit dem im

Folgenden beschriebenen experimentellen Ansatz soll getestet werden, ob rekombinant hergestellte cPKC α , nPKC ϵ oder PKA, die als Effektoren von Gallensäurensignalen diskutiert werden, MRP2 phosphorylieren.

2.3.1 Immunpräzipitation von MRP2 aus HepG2-Zellen

Das Transportprotein MRP2 wurde nach einem Protokoll von Dr. Yvonne Meier, Universitätsspital Zürich, und Noe *et al.*⁹⁹ aus Zellen der humanen Hepatomzelllinie HepG2 isoliert.

Hep G2 Zellen wurden dazu in 10 cm Kulturschalen angezüchtet, zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml Homogenisationspuffer (20 mmol/l Tris, 250 mmol/l Saccharose, 2 mmol/l EGTA, 10 mmol/l 2-Mercaptoethanol, 50 μ mol/l Leupeptin, 25 μ g/ml Aprotinin, 1 mmol/l PMSF; pH 7,4, 4 °C) abgelöst, abzentrifugiert, erneut in 100 μ l Homogenisationspuffer aufgenommen und für 10 s auf Eis im Sonifier homogenisiert. In einer anschließenden 2-Schritt Ultrazentrifugation ließ sich die Membranfraktion isolieren. Nach Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford wurde die Proteinkonzentration der Proben mit Homogenisationspuffer auf 10 g/l angeglichen und Aliquots von 150 μ l für die weitere Aufarbeitung verwandt. Zur weiteren Lyse von Zellmembranvesikeln und Freisetzung des MRP2 aus der Membranbindung erfolgte unter Zugabe von 150 μ l Lysepuffer (40 % Glycerin, 40 mmol/l Tris, 2 mol/l NaCl, 2,4% FosCholin-12, 2 μ g/ml Leupeptin, 2 μ g/ml Antipain, 2 mmol/l PMSF; pH 8,0) ein zweiter Lyseschritt für 30 min auf Eis mit anschließender Ultrazentrifugation zur Abtrennung von Membranrückständen.

Zur Immunpräzipitation wurden 70 μ l aktivierte Protein A Sepharose Suspension mit 500 μ l IP-Puffer I (140 mmol/l NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0,02 % NaN₃; pH 8,0) und 0,75 μ l Kaninchen-anti-Maus IgG Antikörper versetzt, für 2 h bei RT rotiert und dreimal mit 1 ml IP-Puffer I gewaschen. Nach Zugabe von 480 μ l IP-Puffer I und 20 μ l Maus-anti-MRP2 Antikörper pro Präzipitationsansatz wurde erneut für 2 h inkubiert und dreimal mit 1 ml IP-Puffer II (IP-Puffer I mit 2 g/l Albumin) und einmal mit 0,5 ml IP-Puffer III (IP-Puffer I mit 2 g/l Albumin und 1,0 % Triton X-100) gewaschen. Anschließend erfolgte die eigentliche Immunpräzipitation durch Zugabe von 250 μ l Lysat pro Ansatz für 3 h bei 4°C im Rotor. Zur Durchführung der Phosphorylierungsversuche wurde die Sepharose abschließend dreimal mit 1 ml IP-Puffer III und zweimal mit 1ml

IP-Puffer I gewaschen und der Pufferüberstand vollständig mit einer Gelladespitze entfernt.

2.3.2 Phosphorylierung von MRP2 durch cPKC α , nPKC ϵ und PKA

Aus humanen HepG2-Zellen präzipitiertes MRP2 (s. **Kap. 2.3.1**) wurde *in vitro* durch aktivierte rekombinante cPKC α , nPKC ϵ und PKA phosphoryliert. Dazu wurden den MRP2 Präzipitaten zunächst 1000 U PKA in 63 μ l 50 mmol/l Trispuffer oder 80 mU cPKC α und/oder 80 mU nPKC ϵ in 20 mmol/l Trispuffer mit bzw. ohne 10 nM Staurosporin zugesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 7 μ l ATP-Mix (für PKCs: 10 μ mol/l ATP, 3 μ Ci 32 P-ATP, 5 mmol/l MgCl $_2$, 0,2 mmol/l CaCl $_2$; für PKA: 10 μ mol/l ATP, 3 μ Ci 32 P-ATP, 10 mmol/l MgCl $_2$) gestartet. Nach Inkubation der Reaktionsansätze für 20 min bei 30°C im Thermomixer wurden die Präzipitate abzentrifugiert, einmal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, mit 40 μ l SDS-PAGE-Ladepuffer (0,3 mmol/l Tris, 35 % Glycerin, 2,1% SDS, 0,02 % Bromphenolblau in H $_2$ O) gemischt und für 30 min bei 37 °C reduziert. Je 30 μ l der Proben durchliefen anschließend eine SDS-PAGE in einem 7,5% Polyacrylamidgel. Die Trennung erfolgte für 60 min bei 150 V. Anschließend wurden die Gele für 30 min bei 80°C in einem BioRad Gel-Dryer getrocknet, die radioaktiven Produkte der Phosphorylierungsreaktion per Autoradiographie über 18 h nachgewiesen, die dem 32 P-MRP2-Phosphorylierungsprodukt entsprechenden Banden ausgeschnitten und in einem Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 2100, Packard Instrument Co., Frankfurt/Main) ausgewertet.

2.4 Modell primärer Rattenhepatozyten

2.4.1 Gewinnung und Kultivierung der Zellen

Primäre Rattenhepatozyten wurden in einer Zweischritt-Kollagenaseperfusion nach Seglen ¹⁴⁷ gewonnen. Nach der analog zu den isolierten Rattenleberperfusionsen (s. **Kap. 2.1.1**) durchgeführten Anästhesie und Präparation der Leber wurde diese für ca. 10 min mit einem HBSS/HEPES-Puffer perfundiert (0,4 g/l KCl, 0,06 g/l KH $_2$ PO $_4$,

8 g/l NaCl, 0,048 g/l Na₂HPO₄, 1 g/l D-Glucose, 0,011 g/l Phenolrot-Na, 10 mmol/l HEPES (2,4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethansulfonsäure), 0,35 g/l NaHCO₃). In der folgenden Perfusionsphase mit Kollagenasepuffer (HBSS/HEPES-Puffer mit 1 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l CaCl₂, 200 mg/l Kollagenase) wurde das Kollagengerüst der Leber so lange aufgelöst, bis bei sanftem Druck mit einer Pinzette auf die Leberkapsel sichtbare Eindrücke zurückblieben. Sodann wurde die Leber in eine sterile Kulturschale überführt, mit Kollagenasepuffer übergossen und zügig mit einer Pinzette zerrieben. Die entstehende Zellsuspension wurde in MEM verdünnt, durch ein steriles Nylonnetz (Sefar, Thal, Schweiz) mit einer Porengröße von 80 nm filtriert und nach dem Abzentrifugieren (100 x g, 2 min) zweimal mit eiskaltem MEM gewaschen.

Die Zellen wurden danach in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro cm² in 6-Well-Kulturschalen ausgesät, die zuvor mit 0,01 % Typ I Rattenschwanzkollagen beschichtet worden waren. Für eine Stunde erfolgte die Kultivierung in supplementiertem MEM (0,292 g/l L-Glutamin, 100 nM Insulin, 10% FCS; 37°C, 5% CO₂), um nach einmaligem Waschen der Zellen die Kultur in MEM ohne Zusätze für mindestens drei weitere Stunden fortzuführen. Eine halbe Stunde vor Beginn der Stimulationsversuche für die PI3-Kinase-Assays bzw. zur Erstellung der Phospho-PKB-Zeitkurve (s. **Kap. 2.4.2** bzw. **2.4.4**) wurde das Medium ein weiteres Mal gewechselt.

2.4.2 Erstellung einer Phospho-PKB Zeitkurve

Die Proteinkinase B (PKB/Akt) ist Substrat der PI3-Kinasen. Phosphorylierung der PKB an deren Ser-473-Rest gilt als sensitiver Indikator für die globale PI3-Kinasen Aktivität¹⁴⁸. Zur Festlegung der optimalen Stimulationsdauer für die späteren PI3-Kinase-Assays wurde daher der Phosphorylierungsgrad der PKB mit verschiedenen Stimulationszeiten bestimmt.

Den Medien der wie in **Kap. 2.4.1** beschrieben in 6-Well-Platten kultivierten und vorbereiteten primären Rattenhepatozyten wurden nachstehende Gallensäuren (bzw. DMSO als Kontrolle) zupipettiert, um folgende Endkonzentrationen zu erreichen:

Gruppe	Gallensäuren
1	1‰ DMSO
2	25 µmol/l TLCA
3	50 µmol/l TUDCA
4	50 µmol/l TCA
5	50 µmol/l GCDCA

Tabelle 4: Versuchsbedingungen zur Erstellung der Phospho-PKB Zeitkurve und zur Durchführung der PI3-Kinase Assays

Nach 5, 15, 30 bzw. 60 Minuten Inkubation wurden die Platten schnell auf Eis gestellt, das Medium rasch entfernt und die Zellen dreimal mit 2 ml eiskaltem PBS (pH 7,4) pro Well gewaschen, in 65 µl Zellysepuffer pro Well (20 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 2,5 mmol/l Na-Pyrophosphat, 1 mmol/l β-Glycerophosphat, 10 µl/ml TritonX-100, 1 mmol/l Na₃VO₄, 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin, 500 nM Okadaic Acid) von den Kulturschalen geschabt und in Eppendorfgefäßen für 20 min auf Eis lysiert. Bei 16500 x g wurden die Lysate nun 10 min zentrifugiert, die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt und der Phosphorylierungsgrad der PKB bestimmt (s. **Kap. 2.4.3**). Je 10 µl der Proben wurden zuvor einer Proteinbestimmung nach Lowry¹⁴⁹ zugeführt.

2.4.3 Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der PKB

Aliquots jeder Probe der Stimulationsversuche (s. **Kap. 2.4.2**) wurden einer SDS-PAGE mit 10 % Polyacrylamidgelen unterzogen. Die Trennung erfolgte bei 180 V für 55 min. Anschließend wurden die Proteine über Nacht bei 30 V und 4°C im Kühlraum auf Immobilon-P-Membranen (Millipore Corp., Bedford, USA) übertragen, woraufhin diese für 4 h bei RT zum Blocken getrocknet wurden. Anschließend wurden sie über Nacht mit einem Antikörper gegen Phospho-PKB^{Ser-473} in der Verdünnung von 1:1000 in 5%iger Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) in TBST (8 g/l NaCl, 3 g/l Tris, 0,5% Tween) inkubiert, um die aktivierte Form der PKB zu erfassen. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 10 min in TBST geschwenkt und für 1 h bei Raumtemperatur mit HRP-konjugiertem Ziegen-anti-Maus IgG Antikörpern (1:2000) in 5% Milch in TBST inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 10 min in

TBST wurden die gebundenen Antikörper mit Chemilumineszenz-Reagenz (200 mmol/l Tris, 2,5 mmol/l Luminol, 0,4 mmol/l p-Hydroxyzimtsäure, 5,4mmol/l H₂O₂) auf einem SUPER-RX Film (Fujifilm) sichtbar gemacht.

Um die Gesamt-PKB bestimmen zu können, wurden die Membranen gleich im Anschluss gestrippt. Hierzu wurden sie dreimal für 10 min in TBST gewaschen und für 30 min bei 50 °C in Stripping-Puffer (7,56 g/l Tris·HCl, 20 g/l SDS, 0,2mol/l 2-Mercaptoethanol; pH 6,7) geschwenkt. Daraufhin wurden sie erneut sechsmal für 5 min in TBST gewaschen, für 2 h bei RT in 5% Milch in TBST geblockt und die Gesamt-PKB in identischer Art und Weise mit einem Antikörper gegen Gesamt-PKB (1:2000) bestimmt.

Zur Quantifizierung der Banden von Phospho- und Gesamt-PKB erfolgte die densitometrische Auswertung (NIH Image Densitometric Analysis 1.54, Bethesda, Md., 1994) mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Gel.

2.4.4 PI3-Kinase-Assay

Nach Festlegung geeigneter Stimulationszeiten auf dem Boden der Ergebnisse der Phospho-PKB-Zeitkurven (s. **Kap. 2.4.3**) wurden weitere primäre Rattenhepatozyten gewonnen und zur Durchführung von PI3-Kinase-Aktivitätsassays stimuliert. Den, wie in **Kap. 2.4.1** beschrieben, nun in 100 mm Kulturschalen kultivierten und vorbereiteten Zellen wurden dazu die Gallensäuren TLCA, TUDCA, TCA oder GCDCA (bzw. DMSO als Kontrolle) zupipettiert (s. **Tabelle 4**).

Nach 15minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Schalen auf Eis gestellt, das Medium rasch abgesaugt und die Zellen dreimal mit 4 ml eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Nach Zugabe von 300 µl HEPES-Lysepuffer (50 mmol/l HEPES, 1% NP-40, 10% Glycerol, 0,5 mmol/l EGTA, 0,5 mmol/l PMSF, 5 mmol/l Na₃VO₄, 500 nmol/l Okadaic Acid, 10 µg/ml Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin; pH 7,4, 4°C) wurden die Zellen rasch von den Kulturschalen geschabt, in Eppendorfgefäße überführt, für 10 min auf Eis lysiert, bei 16500 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert und in neue Eppendorfgefäße überführt. Zur Proteinbestimmung nach Lowry¹⁴⁹ wurden 10 µl des Lysats entnommen und die verbleibenden Proben sofort bei -80°C eingefroren.

Immunpräzipitation

Zur gezielten Untersuchung der Aktivität verschiedener PI3-Kinase-Subspezies wurden die Isoformen der katalytischen Einheiten der Klasse I PI3-Kinasen p110 α , p110 β und p110 γ mit Hilfe spezifischer Antikörper präzipitiert.

Zur Präzipitation der α - bzw. β -Isoform wurde Zelllysate entsprechend 250 μ g bzw. 100 μ g Gesamtprotein mit HEPES-Lysepuffer auf 1 μ g/ μ l bzw. 0,5 μ g/ μ l verdünnt und mit 5 μ g anti-PI3-Kinase-p110 α - bzw. anti-PI3-Kinase-p110 β Antikörper versetzt. Nach Rotation für 2 h bei 4°C wurden 20 μ l 50% ProteinA/G-Agarose zugegeben und die Ansätze für eine weitere Stunde rotiert.

Zur Präzipitation der γ -Isoform wurden je Probe 5 μ g anti-PI3-Kinase-p110 γ Antikörper, 0,3 ml HEPES-Lysepuffer und 20 μ l 50% ProteinA/G-Agarose in ein Eppendorfgefäß pipettiert und für 2 h bei 4°C rotiert. Nach Zugabe von Zelllysate entsprechend 400 μ g Gesamtprotein (Endkonzentration von 1 μ g Protein pro μ l) wurden die Ansätze für weitere 3 h unter Rotation inkubiert.

Nach der Präzipitation wurden alle Proben für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert, einmal mit 1 ml eiskaltem HEPES-Lysepuffer und dreimal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und der verbleibende Überstand restlos mit einer Gelladespitze entfernt.

Vorbereitung der Lipide

Je durchzuführendem Assay wurden 10 μ g Phosphatidylinositol, 10 μ g Phosphatidylserin und 10 μ g Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettiert und das Lösungsmittel Chloroform unter Stickstoff vollständig abgeblasen. Nach Zugabe von 10 μ l Ultraschallpuffer (25 mmol/l MOPS, 1 mmol/l EGTA; pH 7,0) wurden die Lipide für 15 min im Ultraschallbad wieder gelöst.

Durchführung der PI3-Kinase-Aktivitätsassays

Jedem der Präzipitate wurden 25 μ l H₂O, 10 μ l PI3-Kinase-Puffer (125 mmol/l MOPS, 25 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l EGTA, 5 mmol/l Na₃OV₄; pH 7,0) und 10 μ l Lipidlösung zupipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte hinter einem Strahlenschutzschild die Zugabe von 5 μ l ATP-Mix (2 μ l [γ -³²P]-ATP (10 μ Ci/ μ l), 0,5 μ l H₂O, 2,5 μ l 3mmol/l ATP) und nach einmaligem Vortexen eine 20minütige Inkubation bei 37°C. Durch Zugabe von 100 μ l Methanol / 1M HCl-Lösung (1:1) wurde die Kinasereaktion gestoppt. Zur Extraktion der Lipide wurden in

zwei Schritten je 100 µl Chloroform zupipettiert, der Ansatz gründlich vermischt, für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert und die untere organische Phase restlos in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach Abdampfen des Chloroforms unter Stickstoff wurden die Lipide erneut in 20 µl Chloroform aufgenommen und auf eine Silica Gel Dünnschichtchromatographieplatte (Whatman Inc., Sanford, Maine, USA) aufgetragen. Die Platten wurden für 30 min bei RT getrocknet und in die Dünnschichtchromatographiekammer gestellt. Durch den kapillaren Aufstieg des Fließmittels (n-Propanol : H₂O : 100% Essigsäure = 34:65:1) erfolgte über Nacht die chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte der PI3-Kinasen Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat und Phosphatidylinositol-3-phosphat. Nach 15minütigem Trocknen der Platten erfolgte die Exposition gegenüber einem X-OMAT Film (Kodak, Rochester, N.Y., USA) für zwei Stunden bis zu zwei Tagen bei -80°C und nach Entwicklung des Films waren die o.g. Reaktionsprodukte als umschriebene Banden sichtbar. Die diesen Banden auf dem Film entsprechenden Bereiche der Chromatographieplatte wurden ausgeschnitten, mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und der radioaktive Zerfall in einer Szintillationszählkammer bestimmt.

2.5 Modell der Ntcp-transfizierten HepG2-Zelle

Die humane Hepatomzelllinie „HepG2“ wird vielfach zur Untersuchung von hepatozellulären Vorgängen genutzt. In unserer Arbeitsgruppe wurde sie mit dem Gen des Gallensäuretransporters Ntcp transfiziert, um Auswirkungen von Gallensäuren auf die membranäre Dichte der Konjugatexportpumpe Mrp2 untersuchen zu können und um die diesen Effekten zugrunde liegenden Signalwege zu entschlüsseln.

2.5.1 Kultivierung der Zellen

HepG2-Zellen (ATCC HB-8065) wurden in supplementiertem Minimal Essential Medium (MEM, 10 % hitzedeaktiviertes fötales Rinderserum FCS, 1 % nichtessentielle Aminosäuren, 4 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B; pH 7,4,

37°C, 5 % CO₂) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche, einmal wurde eine Zellpassage mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, 0,85 g/l NaCl; pH 7-7,5) durchgeführt².

2.5.2 Stabile Transfektion mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt

Zur stabilen Transfektion mit Ratten-Ntcp wurden HepG2-Zellen auf 6-Well-Gewebekulturplatten in 2 ml serumfreiem Medium ausgesät. Nach Erreichen einer ca. 50 %igen Konfluenz wurden sie mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt transfiziert. Das transfizierte Plasmid enthielt neben dem Gen des Gallensäuretransporters Ntcp ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Genitacin, sodass mit Hilfe des Antibiotikums eine Auslese zugunsten der erfolgreich transfizierten Zellen möglich wurde.

Transfektion:

Herstellung des Transfektionsgemisches: Inkubation von 100 µl Optimem mit 5 µl Fugene-Reagenz für 5 min bei Raumtemperatur (RT), danach Zugabe von 2 µg der Plasmid-cDNA und weitere Inkubation für 15 min bei RT.

100 µl Transfektionsgemisch wurden in jede der Vertiefungen der 6-Well-Gewebekulturplatten pipettiert. Nach 4-8 h wurden 10 % FCS zugegeben und die Kultur für 24 h fortgeführt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte durch Inkubation mit 500 µl Trypsin/EDTA-Lösung je Vertiefung für 5 min bei 37 °C ein Ablösen der Zellen von den Kulturschalen. Daraufhin wurde das gleiche Volumen an MEM zur Neutralisation des Trypsins zugegeben, die Zellen abzentrifugiert und in MEM resuspendiert.

Nach Aussaat der Zellen in 10 cm Petrischalen und Inkubation für 24 h erfolgte die Zugabe von 1 mg/ml G418 (Genitacin). Nach Anzüchtung für weitere 14-21 Tage ließen sich Monoklonen erkennen.

Einzelne Klone wurden unter Zuhilfenahme steriler Klonzylinder (Scienceware, Pequannock, NJ, USA) abtrypsiniert, in je zwei Vertiefungen einer 24-Well-Gewebekulturplatte ausgesät und mit 1 ml MEM mit 1 mg/ml Genitacin G418 kultiviert, um eine kontinuierliche Selektion zu Gunsten der effizient transfizierten

HepG2-Zellen zu erreichen. Nach konfluentem Wachstum wurden die Zellen je einer der beiden Vertiefungen abtrypsiniert, abzentrifugiert und nach Resuspension des Rückstandes in einer Lösung aus 90 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren. Die Zellen der entsprechenden zweiten Vertiefung wurden zur Durchführung eines Gallensäure Aufnahme Assays verwendet (s. **Kap. 2.5.3**). Dabei wurde die Aufnahmefähigkeit der neu transfizierten Zellen für Gallensäuren untersucht.²

Der für die Experimente verwendete Klon zeigte über den Verlauf der Versuche stets eine mindestens 100-fache Steigerung der Aufnahmefähigkeit für Gallensäuren gegenüber nicht-transfizierten HepG2-Zellen.

2.5.3 Bestimmung der [³H]-Taurocholsäure-Aufnahme

Die Fähigkeit der Zellen zur Gallensäureaufnahme wurde mit Hilfe der radioaktiv markierten Gallensäure [³H]-TCA nach der Transfektion stets parallel zu den Versuchen kontrolliert, um die stabile Expression von Ntcp auch nach mehreren Zellpassagen zu kontrollieren.

Puffer-Lösungen

Aufnahme-Puffer: 100 mmol/l NaCl, 2 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 5,5 mmol/l D-Glucose, 10 mmol/l N-[2-Hydroxyethyl] Piperazin-N-[2-Ethansulfonsäure]; pH 7,5

Stop-Puffer: 53,7 mg Na-Taurocholat *ad* 100 ml (1 mmol/l TCA)

[³H]-TCA-Puffer: 100 µl Stop-Puffer, 10 µl 10 mmol/l [³H]-TCA (1 µCi / µl) *ad* 9,89 ml Aufnahme-Puffer (10 µmol/l, 1 µCi/ml)

Lysepuffer: 20 mmol/l Tris, 1% Triton, 154 mmol/l NaCl, 40 µl/ml 25xComplete, 1 mmol/l PMSF, 1 mmol/l Na₃OV₄, 10 mmol/l NaF

Nicht-transfizierte HepG2-Zellen als Negativkontrolle und die verwendeten Ntcp-transfizierten Zellen wurden in Mehrfach-Kulturschalen bis zu etwa 90%iger Konfluenz angezüchtet. Nach dreimaligem Waschen mit Aufnahme-Puffer wurden 0,5 ml [³H]-TCA-Puffer pro Well zugegeben und bei 37°C für 20 min inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurde der [³H]-TCA-Puffer abgezogen und die Zellen dreimal mit je 1 ml eiskaltem Stop-Puffer gewaschen. Mit 0,5 ml Lyse-Puffer erfolgte die Lyse der Zellen bei RT (ca. 10 min).

Je 100 µl der Lysate wurden in einer Verdünnung von 1:500 einer Proteinbestimmung nach Bradford ¹⁵⁰ zugeführt und je 400 µl in 10 ml Szintillationslösung verdünnt. Die Zahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute als Maß für die Menge aufgenommener [³H]-TCA wurde mittels eines Packard Tri-Carb 2100 Szintillationsmessgeräts für Flüssigkeiten (Packard Instrument Co., Frankfurt/Main) gezählt. Die ermittelten Zerfälle pro Minute wurden auf den Proteingehalt normalisiert und die Ergebnisse der transfizierten HepG2-Zellen mit jenen der nicht-transfizierten Kontrollen verglichen.

2.5.4 Untersuchungen zur Bedeutung der PI3-Kinase-Isoform p110 γ für Gallensäuren-induzierte Apoptose

In den Untersuchungen zur Aktivierung von Isoformen der PI3-Kinasen durch Gallensäuren in primären Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass eine der untersuchten Isoformen, p110 γ , unter den getesteten Gallensäuren ausschließlich von den hydrophoben, Apoptose-auslösenden Gallensäuren TLCA und GCDCA aktiviert wird. Die folgenden Untersuchungen sollen daher die Bedeutung der PI3-Kinase-Isoform p110 γ für die durch Gallensäuren induzierte Apoptose in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 untersuchen.

2.5.4.1 Caspase 3/7 Aktivität als Maß der Gallensäuren-induzierten Apoptose

Die Caspasen 3 und 7 bilden als so genannte Effektorcaspasen die gemeinsame Endstrecke verschiedener zum programmierten Zelltod führender Signalwege. Über Ihre Aktivität lässt sich daher Apoptose quantifizieren, unabgänglich vom Apoptose-induzierenden Stimulus.

Die wie unter **2.5.1** und **2.5.2** beschrieben kultivierten und mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfizierten HepG2-Zellen wurden 24 Stunden vor

Beginn der Versuche in 96-Well-Gewebekulturplatten zu 25 000 Zellen pro Well in 100µl Zellkulturmedium ausgesät.

Stimulation der Zellen

Das Zellkulturmedium MEM wurde in einem Mischungsverhältnis von 1:1000 mit einer 2,5 millimolaren Stammlösung des Inhibitors der PI3-Kinase p110 γ 5-(2,2-Difluoro-benzol[1,3]dioxoy-5-methylen)-thiazolidin-2,4-dion (AS-604850) versetzt und die für 24 Stunden kultivierten HepG2-Zellen nach einem Mediumwechsel für eine halbe Stunde mit diesem bzw. mit Kontrollmedium (1‰ DMSO) vorinkubiert. Sowohl dem Medium mit Inhibitor als auch dem Kontrollmedium wurden weiter Stammlösungen der Gallensäuren TLCA, GLCA, TCDCA und GCDCA bzw. DMSO zugesetzt, sodass diese eine Endkonzentration von 20, 20, 75 und 75 µM bzw. 2‰ erreichten. Weitere Stimulationsmedien enthielten die apoptotisch wirksamen Agenzien Etoposid (200µM) bzw. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α)/Actinomycin D (28ng/ml und 200ng/ml), um auch Gallensäuren-unabhängige Apoptose zu untersuchen. Nach erneutem Mediumwechsel am Ende der Vorinkubation wurden die Zellen mit diesen Stimulationsmedien für 4 Stunden weiter inkubiert, sodass folgende Bedingungen getestet wurden:

Gruppe	Stimulation	Inhibitor
1	1‰ DMSO	1 ‰ DMSO
2	20 µM TLCA	1 ‰ DMSO
3	20 µM GLCA	1 ‰ DMSO
4	70 µM TCDCA	1 ‰ DMSO
4	70 µM GCDCA	1 ‰ DMSO
5	200µM Etoposid	1 ‰ DMSO
6	28ng/ml TNF α + 200ng/ml Actinomycin D	1 ‰ DMSO
7	1‰ DMSO	2,5 µM AS-604850
8	20 µM TLCA	2,5 µM AS-604850
9	20 µM GLCA	2,5 µM AS-604850
10	75 µM TCDCA	2,5 µM AS-604850
11	75 µM GCDCA	2,5 µM AS-604850
12	200µM Etoposid	2,5 µM AS-604850
13	28ng/ml TNF α + 200ng/ml Actinomycin D	2,5 µM AS-604850

Tabelle 5: Versuchsbedingungen zur Stimulation von HepG2-Zellen für Caspase 3/7 Assays

Caspase 3/7 Aktivitätsassay

Am Ende der Vorbehandlungs- und Stimulationszeit von insgesamt 4,5 Stunden wurden die Zellkulturplatten aus dem Inkubationsschrank entnommen und sogleich mit 100µl des Reagenz/Substrat-Gemischs eines kommerziell erhältlichen Caspase 3/7 Assays „Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay“ (Promega) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zellmembranen werden durch den in diesem Assay enthaltenen Puffer permeabilisiert, dies erlaubt u.a. den Austritt aktivierter Caspasen in den Mediumüberstand. Aktivierte Caspasen 3 und 7 spalten ihr im Puffer enthaltenes Substrat Rhodamin110,bis-(N-CBZL-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspartat-Amid) (Z-DEVD-R110) und das fluoreszierende Rhodamin wird frei.

Am Ende der Inkubationszeit wurde die Menge freien Rhodamins als Maß der Caspase 3/7-Aktivität in einem Fluoreszenzmessgerät durch Anregung mit Licht der Wellenlänge von 499nm und Messung des Fluoreszenzsignals bei 521nm bestimmt. Die so ermittelten Werte wurden auf jene unstimulierter HepG2-Zellen normalisiert.

2.5.4.2 Morphologische Evaluierung der Apoptoserate

Neben der enzymatischen Bestimmung der Apoptoserate mithilfe des Caspase 3/7 Assays (s.o.) wurde der Anteil apoptotischer Zellen auch morphologisch evaluiert. Die Kultur und Stimulation der Zellen erfolgte dazu wie unter **2.5.4.1** beschrieben. Am Ende der Stimulationszeit wurden die HepG2-Zellen rasch mit eiskaltem PBS gewaschen, auf Eis gestellt und über Nacht in 3%iger Formaldehydlösung konserviert. Die Konservierungslösung enthielt außerdem 0,01mg/ml des Kernfärbungsreagenz Hoechst33342. Am folgenden Tag wurden, unter Anregung der Zellen mit einem Argonlaser, unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem für Licht der Wellenlänge um 480nm durchlässigen Filter durchschnittlich 400 Zellen ausgezählt und der Anteil der fragmentierten Zellkerne bestimmt, die als Anzeichen eines ablaufenden Apoptoseprozesses gelten.

2.5.4.3 Transiente Transfektion mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ

Die wie unter **2.5.1** und **2.5.2** beschrieben kultivierten und mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfizierten HepG2-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in 96-Well-Gewebekulturplatten zu 10 000 Zellen pro Well in 100 μ l MEM ohne FCS und ohne Antibiotika/Antimykotika ausgesät.

Pro Well wurden 0,25 μ l des Transfektionsreagenz Oligofectamine[®] und 5pmol siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ bzw. nonsense-siRNA in 2 μ l des kommerziell erhältlichen Transfektionsmediums Opti-MEM[®] verdünnt und den am Vortag ausgesäten Zellen hinzupipettiert.

Nach 72 h wurde das alte Zellkulturmedium abgezogen und 100 μ l MEM mit 1‰ H₂O, 1‰ DMSO, 20 μ M TLCA, 20 μ M GLCA, 75 μ M TCDCA bzw. 75 μ M GCDCA zugegeben. Nach 4 Stunden bestimmten wir das Maß der Apoptose in einem Caspase 3/7-Assay wie unter **2.5.4.1** beschrieben und normalisierten die ermittelten Werte auf die Referenz mit 1‰ H₂O als Stimulans. Die Apoptoserate der mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ transfizierten Zellen wurde mit jener scheintransfizierter Zellen verglichen.

2.5.5 Biotinylierung von Membranproteinen als Indikator für das Maß der Membraninsertion

Hepatozyten können ihre Sekretionskapazität unter anderem durch Modulation der Zahl der Transportproteine in der apikalen Membran regulieren (s. **Kap. 1.1.1.2, 1.1.1.3** und **1.1.2.1 mit 1.1.2.3**). Um diese Anpassung zu ermöglichen, steht submembranär ein Pool von Transportproteinen in vesikulären Strukturen zur Verfügung. Um den durch Gallensäuren gesteigerten (TUDCA) oder verminderten (TLCA) Einbau von Transportproteinen und speziell der Konjugatexportpumpe MRP2 aus dem intrazellulären Pool in die kanalikuläre Membran von Leberzellen *in vitro* nachvollziehen und weiter charakterisieren zu können, etablierten wir eine Methode der Biotinylierung von Membranproteinen in unserem Modell Ntcp-transfizierter HepG2-Zellen.

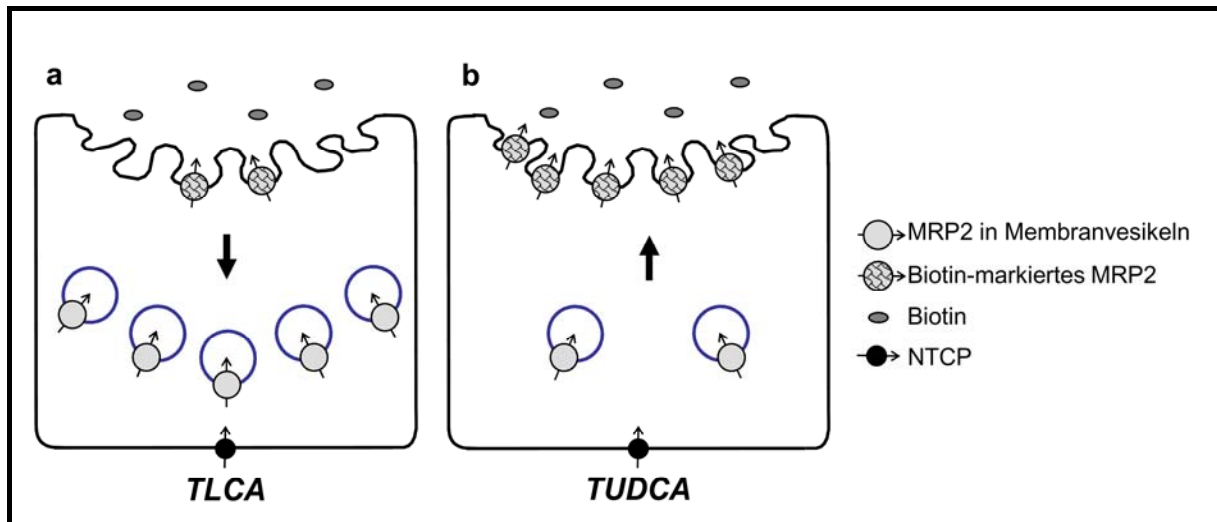


Abbildung 11: Biotinylierung von MRP2 nach Gallensäurenstimulation

Hintergrund

In dem Reagenz Sulfo-NHS-SS-Biotin (Sufosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionat) ist ein Biotinmolekül über eine S-S-Doppelbindung an einen N-Hydroxy-sulfosuccinimidrest gebunden. Durch Abspaltung des Hydroxy-sulfosuccinimids kann Biotin unter geeigneten Bedingungen kovalent an primäre Amine binden, die unter den Aminosäuren nur im Lysin vorkommen. Wird das Reagenz auf intakten Zellen eingesetzt, werden daher exklusiv alle extrazellulär stehenden Lysinreste von membranständigen Transportproteinen mit Biotin markiert. Da das Reagenz nicht membrangängig ist, werden intrazellulär vorliegende Proteine nicht biotinyliert. Nach Lyse der Zellen können die mit Biotin markierten, vormals membranständigen Transportproteine mit Hilfe von Neutraavidin-konjugierter Agarose präzipitiert und damit von den nicht-biotinylierten Transportproteinen des intrazellulären Pools differenziert werden. Zur Quantifizierung des membranären Anteils der Transportproteine dient ein anschließender Western Blot.

Abbildung 11 zeigt schematisch die angenommenen Verhältnisse unter Gallensäurenstimulation: durch Stimulation mit TLCA (s. Abbildung 11a) wird MRP2 aus der Membran in den intrazellulären Transporterpool entfernt. Dadurch können nur wenige MRP2 Proteine biotinyliert werden, das Signal im Western Blot nach Agarose-Präzipitation wird entsprechend schwach ausfallen. Umgekehrt zeigt Abbildung 11b die durch TUDCA erhöhte Transporterdichte in der Hepatozytenmembran. Ein Großteil des MRP2 kann hier biotinyliert werden, resultierend in einem nach Präzipitation verstärkten Signal im Western Blot.

Durchführung

Für die Versuche wurden Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen für drei Tage in 6-Well-Gewebekulturgefäßen in 2 ml supplementiertem Dulbeccos MEM (DMEM, 4,5g/l Glucose, 10 % FCS, 1 % nichtessentielle Aminosäuren, 4 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B, 1 mg/ml G418) nach Aussaat von $6,0 \times 10^5$ Zellen/Well angezüchtet. Zur Stimulation mit Gallensäuren wurden die Zellen einmal mit 2 ml DMEM ohne Zusätze gewaschen, danach 2 ml Stimulationsmedium (DMEM + Gallensäure, cAMP oder DMSO als Kontrolle) aufgebracht und die Zellen für 15 min inkubiert. **Tabelle 6** zeigt die dabei untersuchten Bedingungen:

Gruppe	Stimulation
1	1‰ DMSO
2	50 µM TLCA
3	50 µM TUDCA
4	50 µM TLCA + 50 µM TUDCA
5	10 µM cAMP

Tabelle 6: Versuchsbedingungen zur Stimulation von HepG2-Zellen für die Membranbiotinylierung

cAMP wurde dabei als Positivkontrolle für das Ansprechen der Zellen auf die Stimulation verwendet, da gezeigt wurde, dass es in primären Rattenhepatozyten die plasmamembranäre Dichte von Mrp2 deutlich erhöht⁶⁹.

Am Ende der Stimulation wurden die Zellen viermal mit 4 ml eiskaltem Biotinylierungspuffer (0,62 g/l Borsäure, 9,0 g/l NaCl, 0,54 g/l KCl, 0,26 g/l CaCl₂·2 H₂O; pH 9,0) gewaschen, vorsichtig mit einem Zellschaber in 1 ml Biotinylierungspuffer abgelöst und in ein Eppendorfcup überführt. Nach Zugabe von je 80 µl Biotin-Reagenz-Lösung (10 mmol/l Sulfo-NHS-SS-Biotin in H₂O) folgte eine 30 minütige Inkubation bei 4°C im Rotor. Danach wurden die Zellen bei 160 x g schonend abzentrifugiert und dreimal mit 1 ml Biotinylierungspuffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 180 µl Lysepuffer (20 mmol/l Tris, 1% Triton, 154 mmol/l NaCl, 1 mmol/l PMSF, 1 mmol/l Na₃VO₄, 10 mmol/l NaF, 40 µl/ml 25fach Complete in H₂O) resuspendiert, für 5 s mit einem Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen und für weitere 30 min bei 4°C lysiert.

Anschließend wurden die Proben bei 16500 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert, das Zelllysate abgehoben und das Pellet verworfen.

Zur Präzipitation der biotinylierten Membranproteine wurden 40 µl 50% Neutravidin-Agarose-Suspension je Probe mit DPBS (8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄, 0,2 g/l KH₂PO₄) gewaschen, mit 100 µl des Lysats versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Agarose bei 2500 x g und 4 °C für 2 min zentrifugiert und viermal mit 1 ml eiskaltem DPBS mit 1 mmol/l PMSF gewaschen und nach dem letzten Waschschrift das verbliebene DPBS mit einer Gelladespitze vollständig entfernt. Anschließend wurden die Präzipitate mit 15 µl 2-fach Auftragspuffer (2 ml 10% SDS + 2 ml 0,5 mol/l Tris, pH 6,8 + 2,5 ml Glycerin + 3,4 ml H₂O + 0,1 ml 1% Bromphenolblau) versetzt, gevortext und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Außerdem wurden Aliquots der Zelllysate mit 2-fach Auftragspuffer versetzt und ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert. Beide Proben (Präzipitat und Gesamtlysate) durchliefen eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in 8 % Polyacrylamidgelen für 60 min bei 150 V mit anschließendem Transfer auf eine PVDF Membran. Die Membranen wurden für 1 h bei RT in 5%iger Milch in TBST (20 mmol/l Tris, 137 mmol/l NaCl, 0,1 % Tween; pH 7,6) geblockt. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation mit monoklonalem Maus-anti-MRP2-Antikörper (Verdünnung 1:1000) und mit monoklonalem Maus-anti-GAPDH Antikörper (Verdünnung 1:200.000). Nach dreimaligem Waschen der Membranen für 5 min mit TBST schloss sich die Inkubation mit dem Zweitantikörper Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP an. Die gebundenen Antikörper wurden nach nochmaligem Waschen mittels Auftrag eines Chemilumineszenz-Reagenz und Exposition gegenüber einem Kodak BiomaxMR Film sichtbar gemacht und die entstehenden Banden für MRP2 und GAPDH densitometrisch ausgewertet.

Nachweis von GAPDH in den Western Blots der Präzipitate zeigte eine Kontamination des Präzipitats mit intrazellulärem Protein und damit unspezifische Ergebnisse an.

2.6 Materialien

2.6.1 Labor Prof. Dr. Beuers, LMU München

Perfusionsversuche: Gallensäuren und Dimethylsulfoxid (DMSO) von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) von ICN Biomedicals Inc. (Aurora, OH, USA); Staurosporin, Gö6976, H89, SB 202 190, SB 202 474 und PD 98 059 von Calbiochem-Novabiochem Corp. (Nottingham, UK); Narcoren[®] von Merial (Hallbergmoos).

In vitro Kinasenaktivität: rekombinante Proteinkinasen PKA, cPKC α und nPKC ϵ von Calbiochem-Novabiochem Corp. (Nottingham, UK); MBP von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); [γ -³²P]-ATP von Perkin Elmer Life Science (Boston, MA, USA).

MRP2-Präzipitation und -Phosphorylierung: FosCholin[®]-12 und n-Dodecylphosphocholin von Anatrace (Maumee, OH, USA); anti-MRP2 Antikörper von Alexis (Lausen, Schweiz); Kaninchen-anti-Maus IgG von MPBio (Solon, OH, USA); Protein A Sepharose von Zymed (San Francisco, CA, USA); [γ -³²P]-ATP von Amersham Biosciences (Freiburg).

Zellkultur: Optimem[®] und G418 (Genitacin) von Gibco (Langley, OK, USA), Fugene-Transfektions-Reagenz von Roche Diagnostics (Mannheim); sterile Klonzylinder von Scienceware (Pequannock, NJ, USA); [3H]-markierte Taurocholsäure von Perkin Elmer Life Science (Boston, MA, USA); p110 γ - und Kontroll-siRNA von Dharmacon (Chicago, IL, USA); Oligofectamine von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Western Blot: Western Blot-Chemilumineszenzreagenz von Perkin Elmer Life Science (Boston, MA, USA); PVDF-Membranen von Millipore (Bedford, MA, USA); Marker molecular weight standard[®] und Ziege-anti-Maus IgG-HRP Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Maus-anti-MRP2 M₂III-6 von Alexis (San Diego, CA, USA); Kaninchen-anti-P-CREB Antikörper und monoklonaler CREB Antikörper von Cell Signalling (Danvers, MA, USA); monoklonaler Maus-anti-GAPDH Antikörper von Abcam (Cambridge, UK); Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP von Bio-Rad Lab (München).

Sonstige: cAMP ELISA Kit von Amersham Biosciences (Freiburg); Complete[®] “protease inhibitor cocktail” von Roche Diagnostics (Mannheim); Szintillations-Cocktail Ultima Gold[®] von Canberra Packard (Frankfurt/Main); Bradford Proteinassay von BioRad (Hercules, CA, USA); Tina 2.0 Software von Raytest (Straubenhardt); ATP von Fluka (Taufkirchen).

Diese und alle weiteren verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Materialien waren von höchster erhältlicher Qualität.

2.6.2 Labor Prof. Dr. Anwer, Tufts University Boston

Kollagenase, Gallensäuren und alle Medien und Reagenzien für die Zellkultur waren von Sigma-Aldrich Chemical Company (St Louis, MO, USA); [γ -³²P]-ATP von Perkin Elmer (Boston, MA, USA); anti-Phospho-PKB^{ser473} Antikörper, anti-PKB Antikörper und anti-PI3-Kinase p110 γ Antikörper von Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA); anti-PI3-Kinase p110 β Antikörper von Upstate Biotechnology (Charlesville, VA, USA); anti-PI3-Kinase p110 α Antikörper, Luminol und Protein A/G Agarose von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

Diese und alle weiteren verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Materialien waren von höchster erhältlicher Qualität.

2.7 Tiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (Labor Prof. Beuers) bzw. Wistar-Ratten (Labor Prof. Anwer) wurden von Charles River (Sulzfeld bzw. Wilmington, MA, USA) bezogen. Sie wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 24 °C in einem 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Freier Zugang zu Nahrung und Wasser war gewährleistet.

2.8 Statistik

Die Resultate der Experimente wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) beschrieben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden je nach Experimentaufbau mit einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) oder dem Student t-Test beschrieben. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel 2000 und WinStat von Microsoft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit der anticholestatischen Wirkung der TUDCA von PKC-Isoformen und PKA

3.1.1 *In vitro* Untersuchungen zur Wirksamkeit der verwendeten Inhibitoren

Die Wirkung der in den Perfusionsversuchen verwendeten Inhibitoren auf die Aktivität von cPKC α , nPKC ϵ und PKA wurde *in vitro* untersucht (s. **Kap. 2.2**).

Die Aktivität von cPKC α wurde dabei durch den nichtselektiven PKC-Inhibitor Staurosporin (ST, 10 nmol/l) signifikant inhibiert (294 ± 46 vs. 23 ± 3 nmol/g Enzym/min, $p < 0,01$), durch den cPKC-spezifischen Inhibitor Gö6976 (100 nmol/l) lediglich tendenziell (294 ± 46 vs. 163 ± 52 nmol/g Enzym/min). nPKC ϵ wurde ausschließlich von Staurosporin gehemmt (71 ± 11 vs. 7 ± 1 nmol/g Enzym/min, $p < 0,01$). Die Aktivität von PKA wurde sowohl von dem spezifischen PKA-Inhibitor H89 ($4,4 \pm 1,7$ vs. $0,2 \pm 0,1$ pmol/mU Enzym/min, $p < 0,01$) als auch von Staurosporin ($4,4 \pm 1,7$ vs. $1,0 \pm 0,6$ pmol/mU Enzym/min, $p < 0,05$) effektiv reduziert (s. **Tabelle 7**).

3.1.2 Bedeutung von PKC und PKA für die anticholestatische Wirkung von TUDCA bei TLCA-induzierter Cholestase

In isoliert perfundierten Rattenlebern wurde durch Infusion von TLCA eine Cholestase induziert, die durch Koadministration der hydrophilen Gallensäure TUDCA aufgehoben wurde. Durch gleichzeitige Infusion von Inhibitoren der PKC und/oder der PKA wurde die Abhängigkeit der anticholestatischen Wirkung der TUDCA von diesen Signalmediatoren überprüft (s. **Kap. 3.1.2.3**). Um zu zeigen, dass die dabei aktivierten Signalwege für TUDCA spezifisch sind, wurden die Effekte der PKC- und PKA- Inhibitoren auch auf die anticholestatische Wirkung der TCA überprüft (s. **Kap. 3.1.2.4**).

	cPKC α		nPKC ϵ		PKA	
Inhibitor	[nmol/g/min]	(%)	[nmol/g/min]	(%)	[pmol/mU/min]	(%)
H ₂ O (Standard)	309 \pm 74	(100)	77 \pm 19	(100)	4,4 \pm 1,7	(100)
DMSO	294 \pm 46	(96)	71 \pm 11	(96)	4,7 \pm 1,6	(111)
ST, 10nM	23 \pm 3 **	(8)	7 \pm 1 **	(9)	1,0 \pm 0,6 *	(22)
Gö6976, 100nM	163 \pm 52	(53)	61 \pm 10	(82)	4,2 \pm 1,5	(98)
H89, 100nM	217 \pm 53	(71)	44 \pm 8	(58)	0,2 \pm 0,1 **	(5)
ST + H89	23 \pm 4 **	(8)	6 \pm 1 **	(8)	0,1 \pm 0,1 **	(2)

Tabelle 7: Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren auf die *in vitro* Aktivität von cPKC α , nPKC ϵ und PKA (MW \pm SD, n = 4-5, ** p<0,01, * p<0,05 vs. DMSO, ANOVA)

3.1.2.1 Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion unter Kontrollbedingungen

Rattenlebern wurden isoliert über 115 min mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Zwischen der 65. und 75. min wurde zusätzlich das Modellanion CDNB infundiert, um die Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 erfassen zu können.

Der Gallenfluß der unbehandelten Kontrollen (Gruppe A 1) lag im Mittel über den gesamten Versuch bei 1,15 \pm 0,20 μ l pro Gramm Lebergewicht pro Minute (μ l/g Leber/min). Als Folge der Infusion von CDNB erfolgte ein passagerer Anstieg des Gallenflusses auf maximal 1,65 \pm 0,10 μ l/g Leber/min, der sich durch das choloretische Potential des CDNB Glutathion-Konjugates GS-DNP erklärt. Die Exkretion von GS-DNP erreichte 15 min nach Beginn der Gabe von CDNB ihr Maximum.

Unter Applikation der hydrophoben Gallensäure TLCA (Gruppe B 1) nahmen sowohl der Gallenfluß als auch die GS-DNP-Sekretion im Vergleich zu den Perfusionen mit der Trägersubstanz DMSO signifikant auf 14% bzw. 7% ab, es kam zur Cholestase. Zusätzliche Gabe von TUDCA (Gruppe C 1) antagonisierte die durch TLCA induzierte Cholestase und hob Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion auf 173% bzw. 113% des Ausgangsniveaus.

Auch TCA (Gruppe D 1) verbesserte die durch TLCA eingeschränkte Leberfunktion deutlich und hob Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion auf 203% bzw. 130% des Ausgangsniveaus.

Infusion von TUDCA alleine (Gruppe E 1) in nicht-cholestatischen Lebern führte zu einem Anstieg von Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion auf 159% bzw. 140% des Ausgangsniveaus (s. **Tabelle 8** und **Abbildung 12** für den Gallenfluß und **Tabelle 9** und **Abbildung 13** für die GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	A 1	B 1	C 1	D 1	E 1
Gallensäure	DMSO	TLCA	TLCA + TUDCA	TLCA + TCA	TUDCA
Inhibitor	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Gallenfluß in µl/g Leber/min					
Σ (66.-115. min)	59,9 ± 6,2	8,5 ± 2,2	103,6 ± 10,2	121,2 ± 9,8	95,0 ± 9,0

Tabelle 8: Gallenfluß unter den Kontrollbedingungen DMSO, TLCA, TLCA + TUDCA, TLCA und TCA (MW ± SD, n = 4-5)

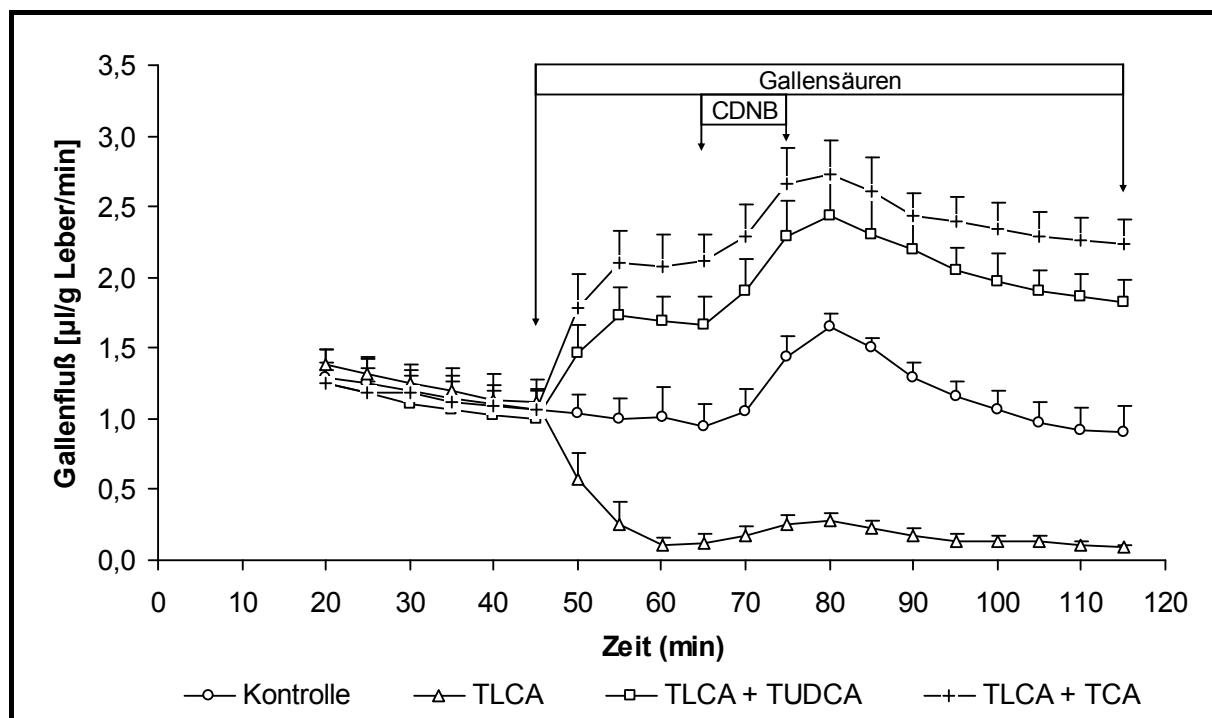


Abbildung 12: Vergleich des Gallenflusses unter den verschiedenen Kontrollbedingungen DMSO, TLCA, TLCA + TUDCA, TLCA + TCA (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	A 1	B 1	C 1	D 1	E 1
Gallensäure	DMSO	TLCA	TLCA + TUDCA	TLCA + TCA	TUDCA
Inhibitor	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min					
Σ (66.-115. min)	871,6 ± 130,9	56,5 ± 22,5	981,6 ± 79,3	1132,5 ± 162,3	1219,5 ± 66,5

Tabelle 9: GS-DNP-Sekretion unter den Kontrollbedingungen DMSO, TLCA, TLCA und TUDCA, TLCA und TCA (MW ± SD, n = 4-5)

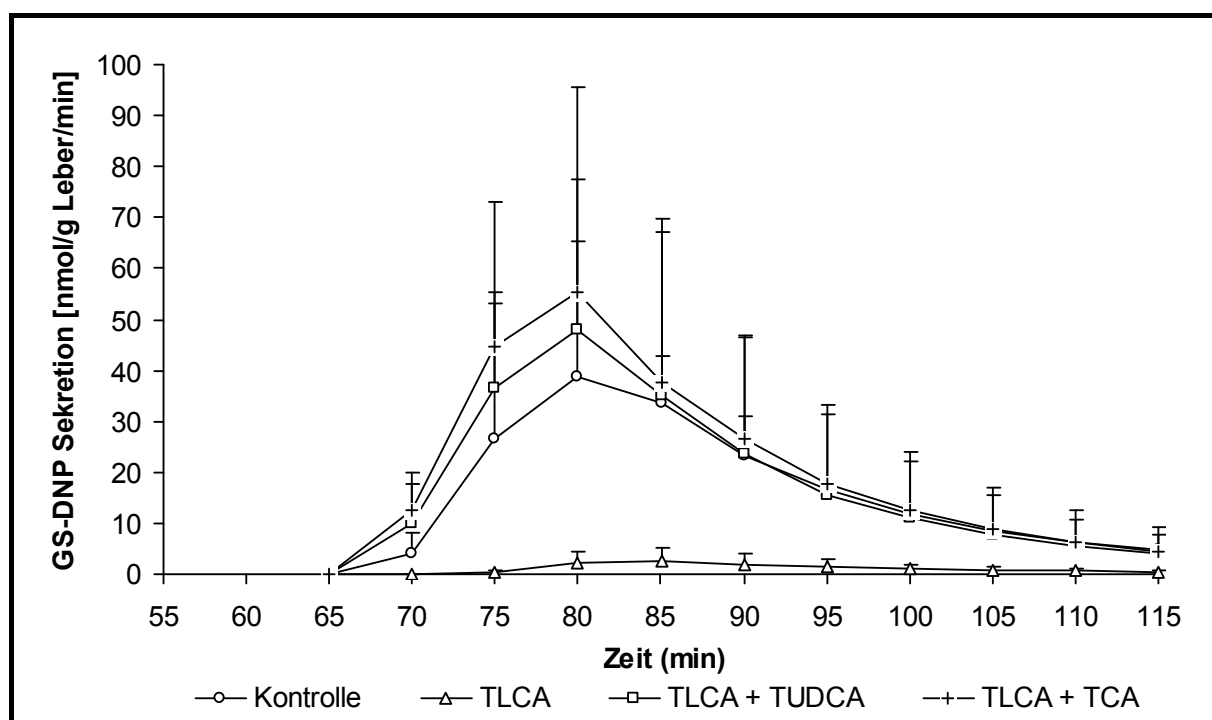


Abbildung 13: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter den Kontrollbedingungen DMSO, TLCA, TLCA und TUDCA, TLCA und TCA (MW ± SD, n = 4-5)

3.1.2.2 Effekt der PKC-/PKA-Inhibition auf Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion unter Basalbedingungen

Die Inhibitoren H89 und Staurosporin wurden von der 21. Minute an gleichzeitig und zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA, TUDCA oder ihrem Träger DMSO (Gruppen E2, B2 bzw. A 2) infundiert. Ausschließlich unter TLCA führten sie zu einer geringen, aber signifikanten Reduktion des Gallenflusses ($8,5 \pm 2,2$ vs. $4,2 \pm 1,3$ $\mu\text{l}/50\text{min}/\text{g}$, $p < 0,05$; s. **Tabelle 10** und **Abbildung 14**) im Vergleich zu den Kontrollversuchen

ohne Inhibitoren (Gruppen E1, B1 bzw. A1). Die GS-DNP-Sekretion (s. **Tabelle 11** und **Abbildung 15**) blieb unter allen Bedingungen unverändert.

Gruppe	A 2	B 2	E 2
Gallensäure	DMSO	TLCA	TUDCA
Inhibitor	H89 + ST	H89 + ST	H89 + ST
Gallenfluß in µl/g Leber/min			
Σ (66.-115. min)	57,2 ± 6,8	4,2 ± 1,3	84,2 ± 7,0

Tabelle 10: Gallenfluß unter H89 + ST zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA oder TUDCA bzw. dem Träger DMSO (MW ± SD, n = 4)

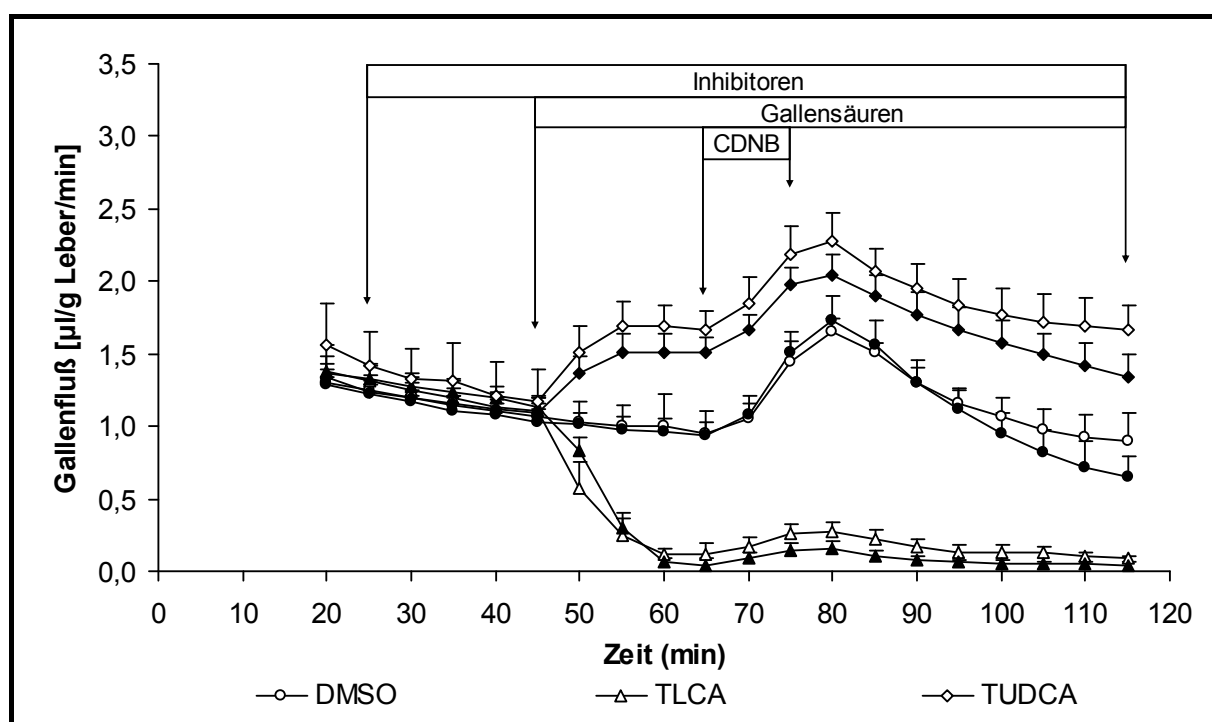


Abbildung 14: Vergleich des Gallenflusses unter den Basalbedingungen DMSO, TLCA und TUDCA mit (●, ▲, ◆) und ohne (○, △, ◇) Inhibitoren H89 + ST (MW ± SD, n = 4)

Gruppe	A 2	B 2	E 2
Gallensäure	DMSO	TLCA	TUDCA
Inhibitor	H89 + ST	H89 + ST	H89 + ST
GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min			
Σ (66.-115. min)	1020,3 ± 121,0	46,6 ± 11,8	1042,1 ± 109,5

Tabelle 11: GS-DNP-Sekretion unter H89 + ST zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA oder TUDCA bzw. dem Träger DMSO (MW ± SD, n = 4)

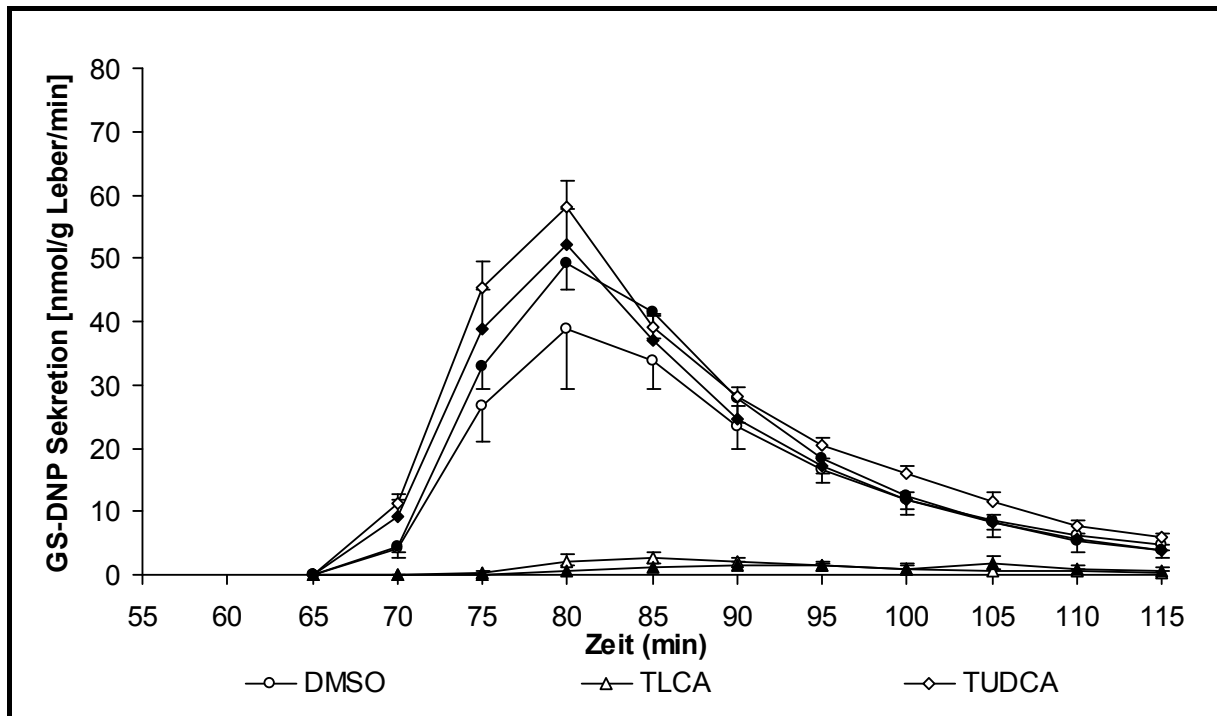


Abbildung 15: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter den Basalbedingungen DMSO, TLCA und TUDCA mit (●, ▲, ◆) und ohne (○, △, ◇) Inhibitoren H89 + ST (MW ± SD, n = 4)

3.1.2.3 Effekt von PKC-/PKA-Inhibitoren auf die anticholestatische Wirkung der TUDCA

Isoliert perfundierte Rattenlebern wurden gleichzeitig mit TLCA und TUDCA behandelt (Gruppe C). Ab der 21. Minute der Versuche erfolgte die Zugabe von Inhibitoren der PKC-Isoformen und der PKA. Es wurde deren Einfluss auf die anticholestatische Wirkung der TUDCA untersucht.

3.1.2.3.1 Effekt von Gö6976

Applikation des Inhibitors Gö6976 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TUDCA (Gruppe C 3) hatte keinen Einfluss auf den Gallenfluß ($103,6 \pm 10,2$ vs. $104,3 \pm 24,0$ $\mu\text{l/g Leber/50min}$), aber senkte tendenziell die GS-DNP-Sekretion auf 76% der Kontrollen ($981,6 \pm 79,3$ vs. $749,4 \pm 203,1$ $\text{nmol/g Leber/50min}$) mit Gallensäuren alleine (Gruppe C 1) (s. **Tabelle 12** und **Abbildung 16** für Gallenfluß, **Tabelle 13** und **Abbildung 17** für GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	C 1	C 3
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	Gö6976
	Gallenfluß in µl/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	103,6 ± 10,2	104,3 ± 24,0

Tabelle 12: Gallenfluß unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5)

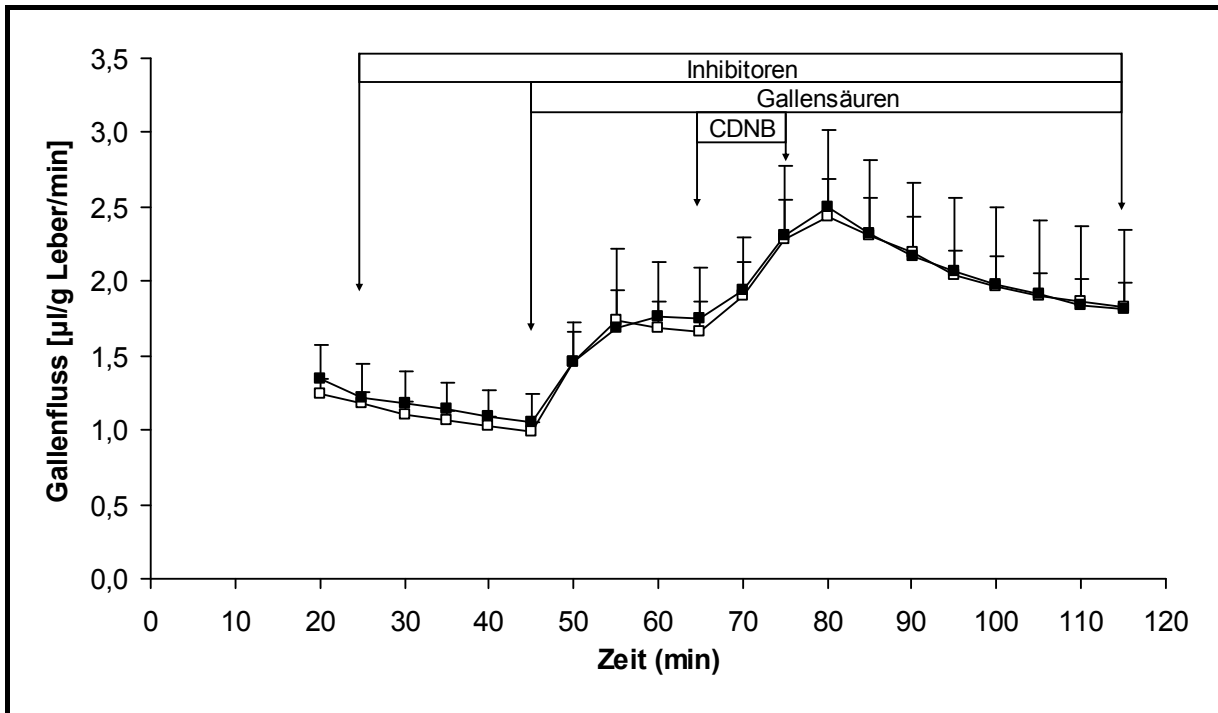


Abbildung 16: Vergleich des Gallenflusses unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	C 1	C 3
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	Gö6976
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	981,6 ± 79,3	749,9 ± 203,1

Tabelle 13: GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5)

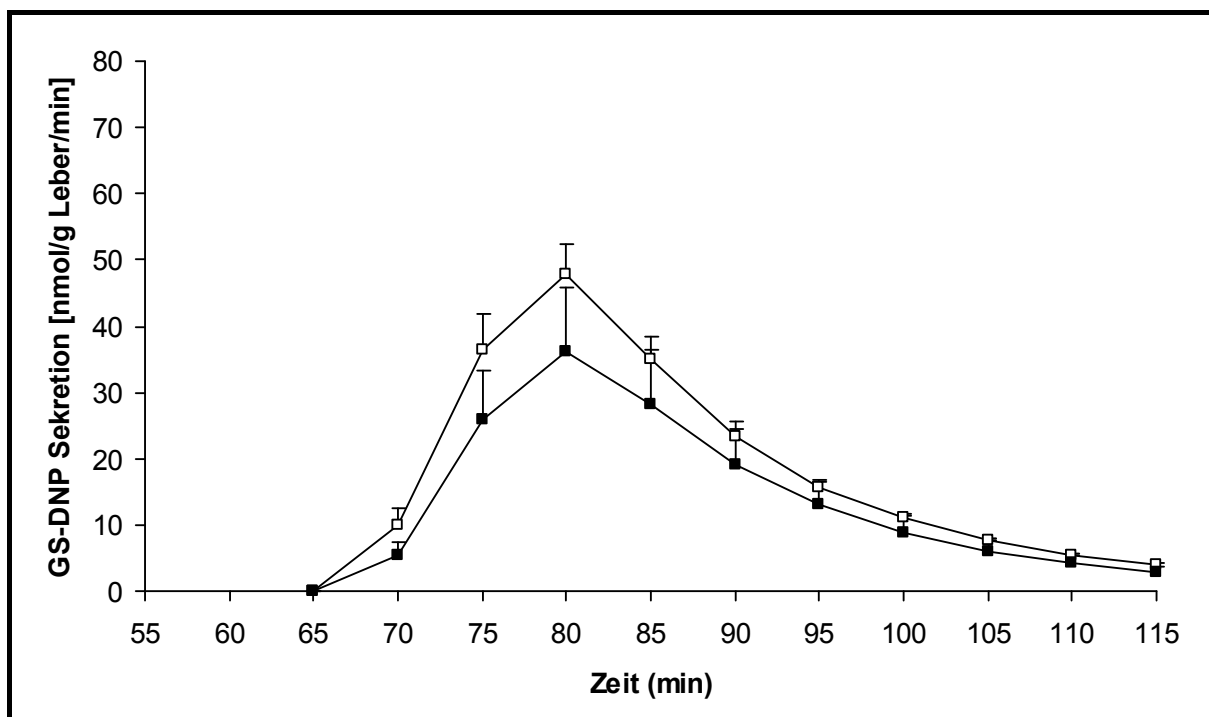


Abbildung 17: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5)

3.1.2.3.2 Effekt von Staurosporin

Applikation von Staurosporin zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TUDCA (Gruppe C 5) senkte den Gallenfluß tendenziell auf 77% ($103,6 \pm 10,2$ vs. $79,8 \pm 11,0$ $\mu\text{l}/50\text{min}/\text{g}$) und die GS-DNP-Sekretion signifikant auf 68% ($981,6 \pm 79,3$ vs. $665,8 \pm 54,2$ $\text{nmol}/50\text{min}/\text{g}$, $p < 0,05$) der Kontrollen mit Gallensäuren alleine (Gruppe C 1) (s. **Tabelle 14** und **Abbildung 18** für den Gallenfluß, **Tabelle 15** und **Abbildung 19** für die GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	C 1	C 5
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	ST
	Gallenfluß in $\mu\text{l}/\text{g}$ Leber/min	
Σ (66.-115. min)	$103,6 \pm 10,2$	$79,8 \pm 11,0$

Tabelle 14: Gallenfluß unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von ST (MW ± SD, n = 4-5)

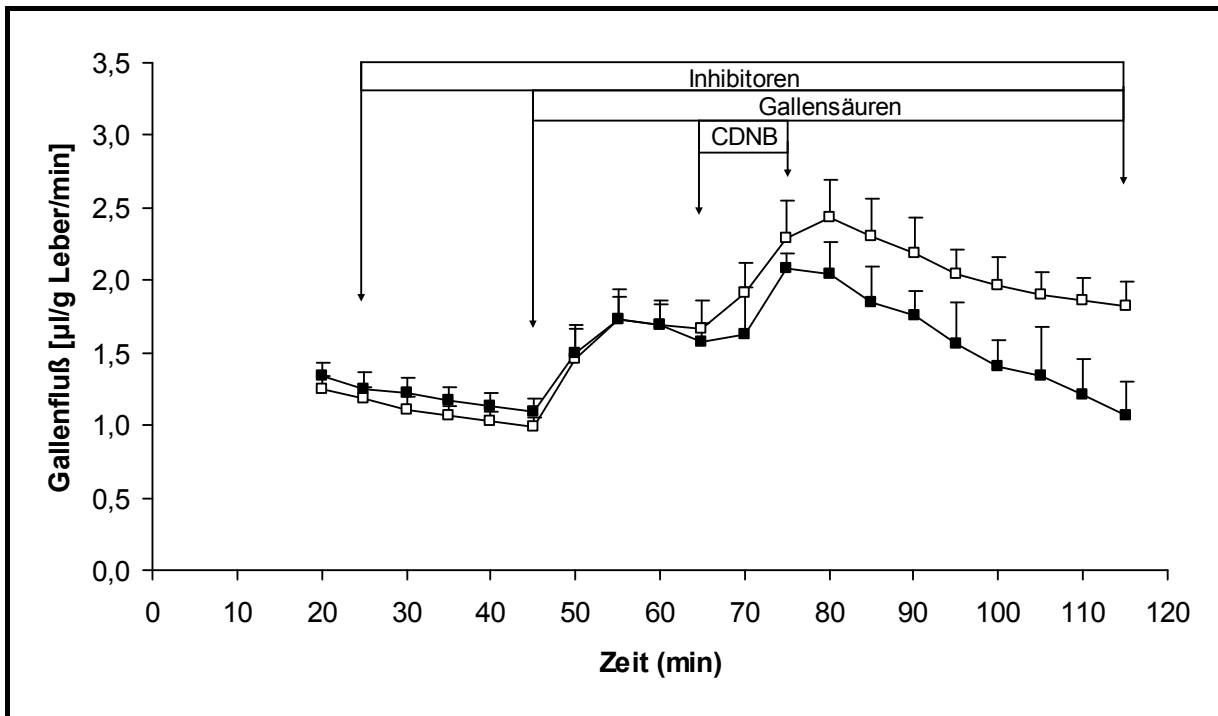


Abbildung 18: Vergleich des Gallenflusses unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von ST (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	C 1	C 5
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	ST
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	981,6 ± 79,3	665,8 ± 54,2

Tabelle 15: GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von ST (MW ± SD, n = 4-5, p<0,05, ANOVA).

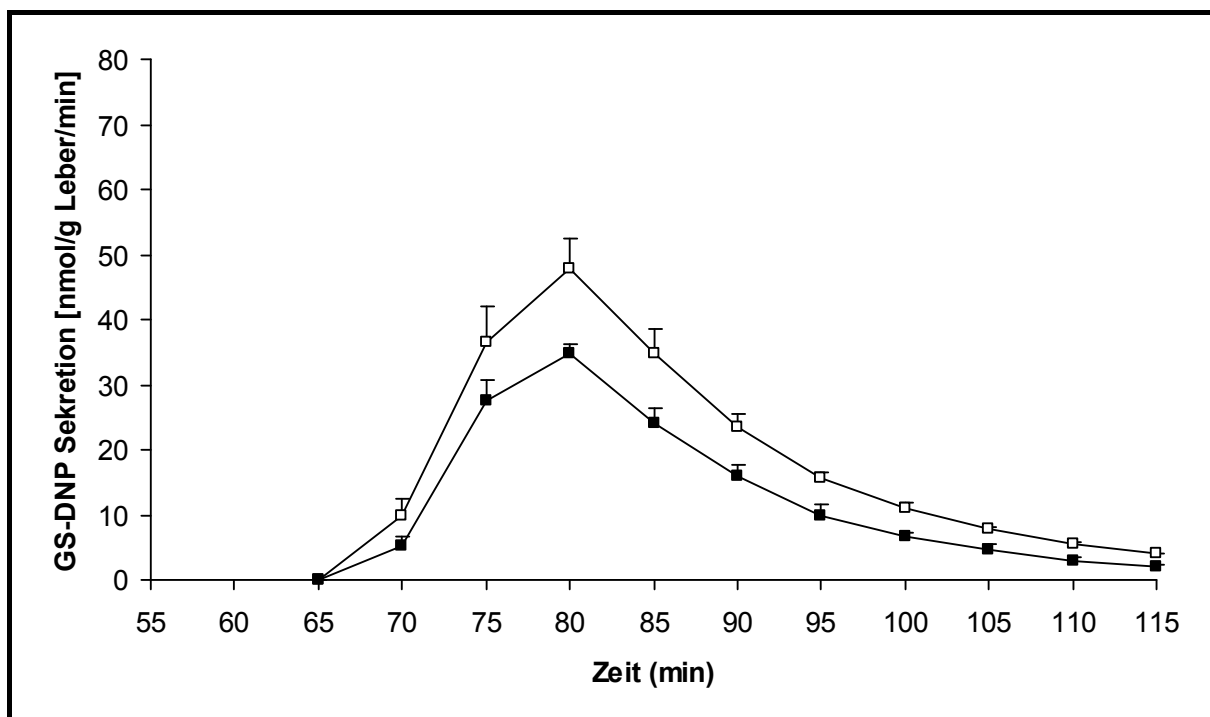


Abbildung 19: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von ST (MW ± SD, n = 4-5)

3.1.2.3.3 Effekt von H89

Behandlung mit dem Inhibitor H89 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA und TUDCA (Gruppe C 6) hatte keinen Einfluss auf Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion im Vergleich zu Kontrollen mit Gallensäuren alleine (Gruppe C 1) (s. **Tabelle 16** und **Abbildung 20** für den Gallenfluß, **Tabelle 17** und **Abbildung 21** für die GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	C 1	C 6
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	H89
	Gallenfluß in µl/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	103,6 ± 10,2	90,3 ± 12,1

Tabelle 16: Gallenfluß unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von H89 (MW ± SD, n = 5)

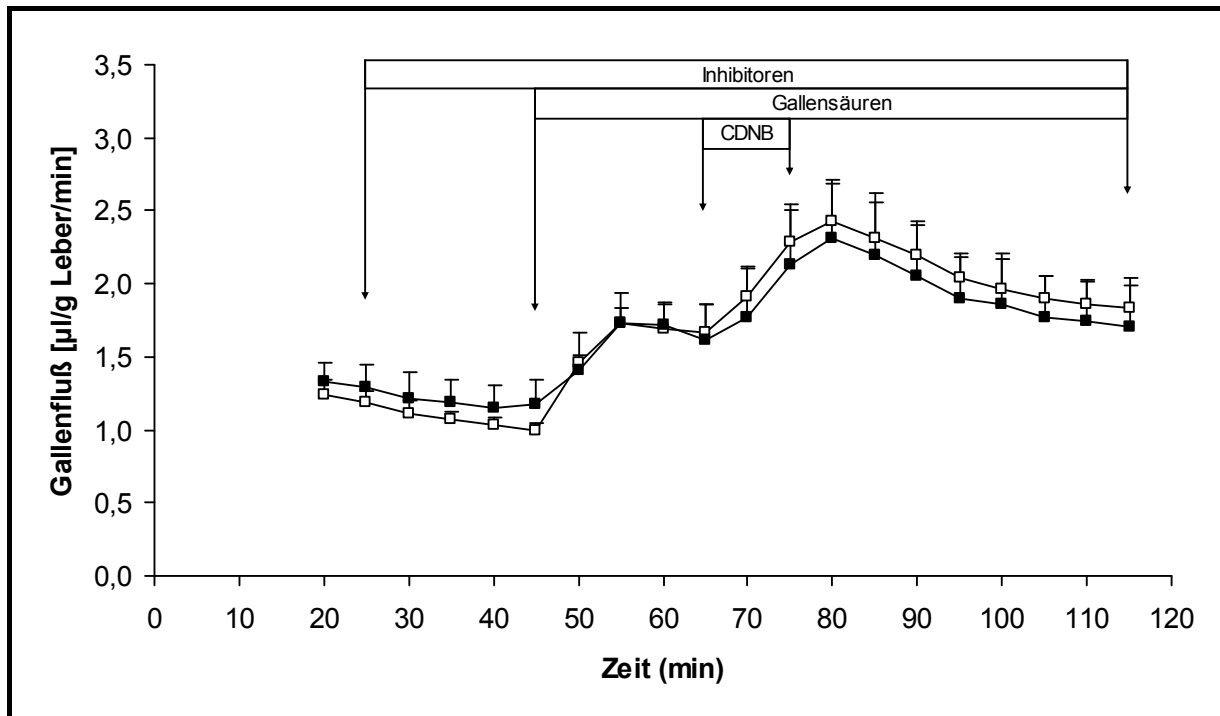


Abbildung 20: Vergleich des Gallenflusses unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von H89 (MW ± SD, n = 5)

Gruppe	C 1	C 6
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	H89
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	981,6 ± 79,3	894,4 ± 168,5

Tabelle 17: GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von H89 (MW ± SD, n = 5)

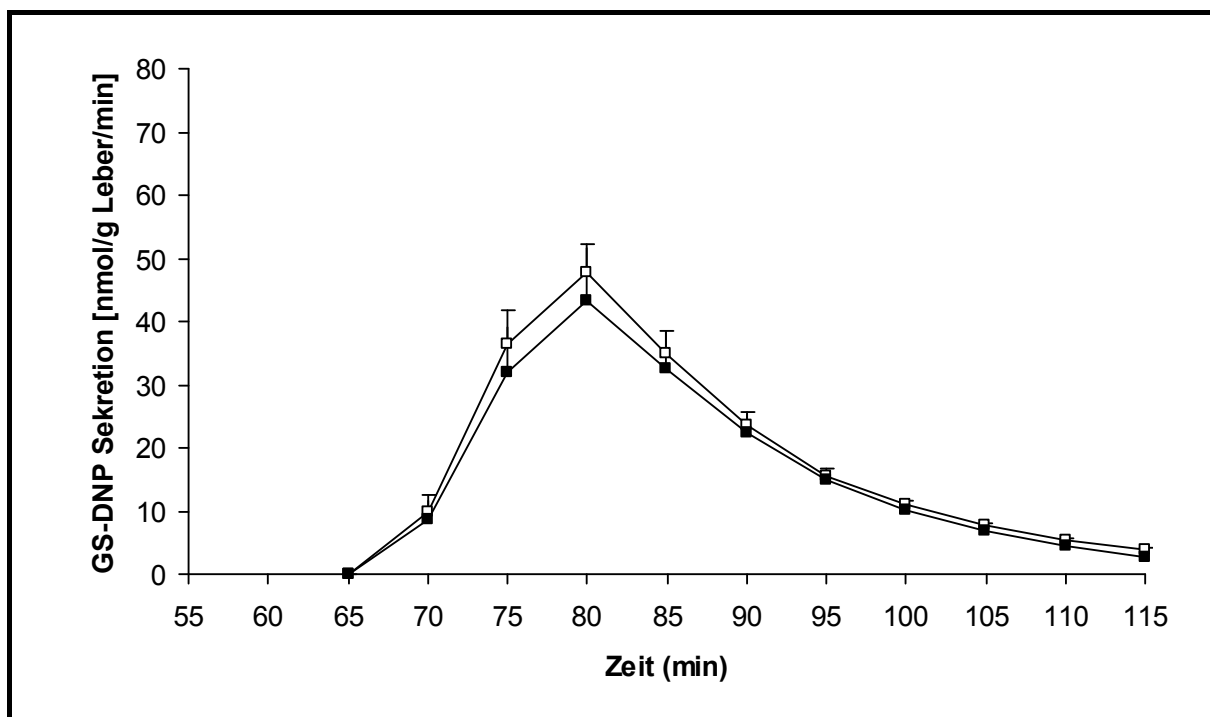


Abbildung 21: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von H89 (MW ± SD, n = 5)

3.1.2.3.4 Effekt der Koadministration von Staurosporin und H89

Gleichzeitige Administration der Inhibitoren Staurosporin und H89 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TUDCA (Gruppe C 2) schließlich senkte sowohl den Gallenfluß ($103,6 \pm 10,2$ vs. $53,9 \pm 15,2$ µl/g Leber/50min, $p < 0,01$) als auch die GS-DNP-Sekretion ($981,6 \pm 79,3$ vs. $580,0 \pm 167,0$ nmol/g Leber/50min, $p < 0,01$) deutlich und hochsignifikant im Vergleich zur Kontrolle mit Gallensäuren alleine (Gruppe C 1) (s. **Tabelle 18** und **Abbildung 22** für den Gallenfluß, **Tabelle 19** und **Abbildung 23** für die GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	C 1	C 2
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	ST + H89
	Gallenfluß in µl/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	$103,6 \pm 10,2$	$53,9 \pm 15,2$

Tabelle 18: Gallenfluß unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von H89 + ST (MW ± SD, n = 4-5, $p < 0,01$, ANOVA)

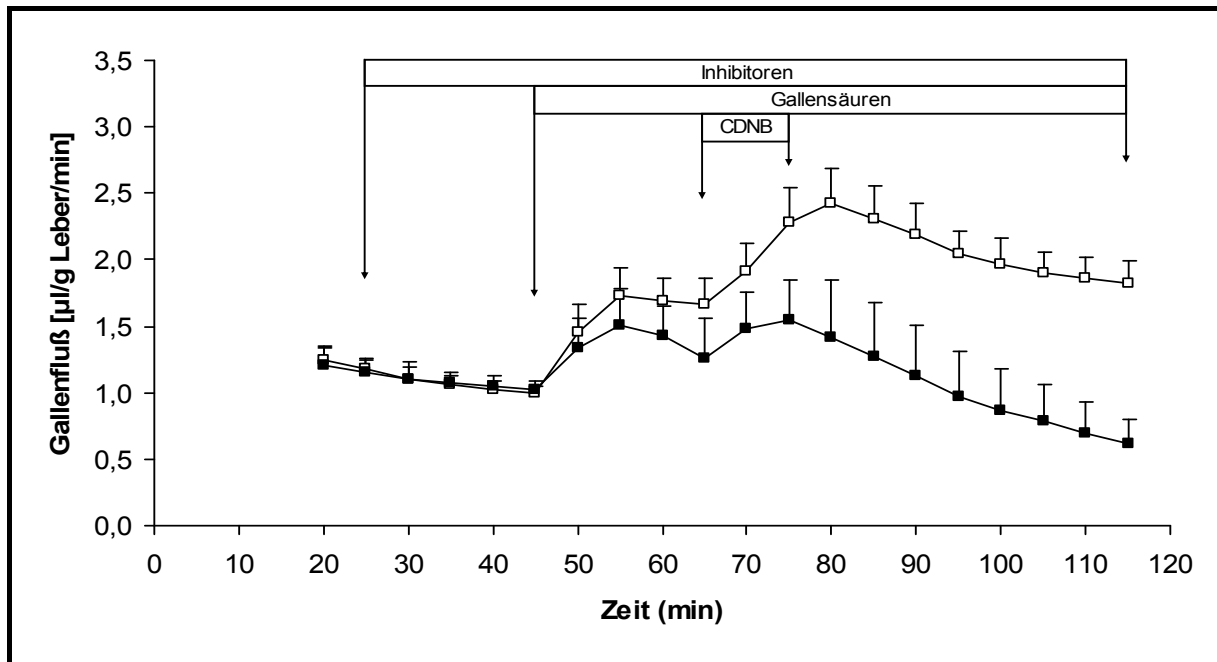


Abbildung 22: Vergleich des Gallenflusses unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von H9 + ST (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	C 1	C 2
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	ST + H89
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	981,6 ± 79,3	580,0 ± 167,0

Tabelle 19: GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von H89 + ST (MW ± SD, n = 4-5, p<0,01, ANOVA)

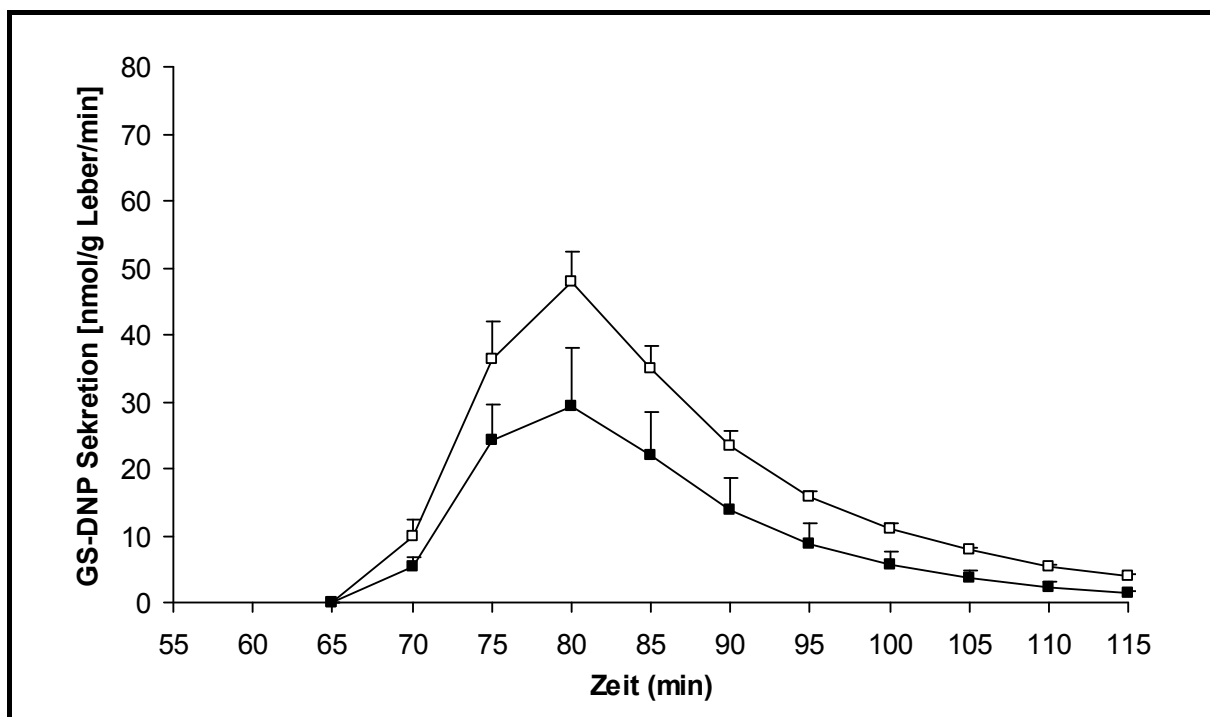


Abbildung 23: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von H89 + ST (MW ± SD, n = 4-5)

3.1.2.3.5 Effekt der Koadministration von H89 und Gö6976

Auch Koadministration des cPKC-spezifischen Inhibitors Gö6976 zusammen mit H89 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TUDCA (Gruppe C 3) senkte sowohl den Gallenfluß ($103,6 \pm 10,2$ vs. $65,9 \pm 18,0$ $\mu\text{l/g Leber}/50\text{min}$, $p < 0,05$) als auch die GS-DNP-Sekretion ($981,6 \pm 79,3$ vs. $675,0 \pm 143,3$ $\text{nmol/g Leber}/50\text{min}$, $p < 0,05$) deutlich und signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit Gallensäuren alleine (Gruppe C 1) (s. **Tabelle 20** und **Abbildung 24** für den Gallenfluß, **Tabelle 21** und **Abbildung 25** für die GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	C 1	C 3
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	Gö6976 + H89
	Gallenfluß in $\mu\text{l/g Leber}/\text{min}$	
Σ (66.-115. min)	$103,6 \pm 10,2$	$65,9 \pm 18,0$

Tabelle 20: Gallenfluß unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von H89 + Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5, $p < 0,01$, ANOVA)

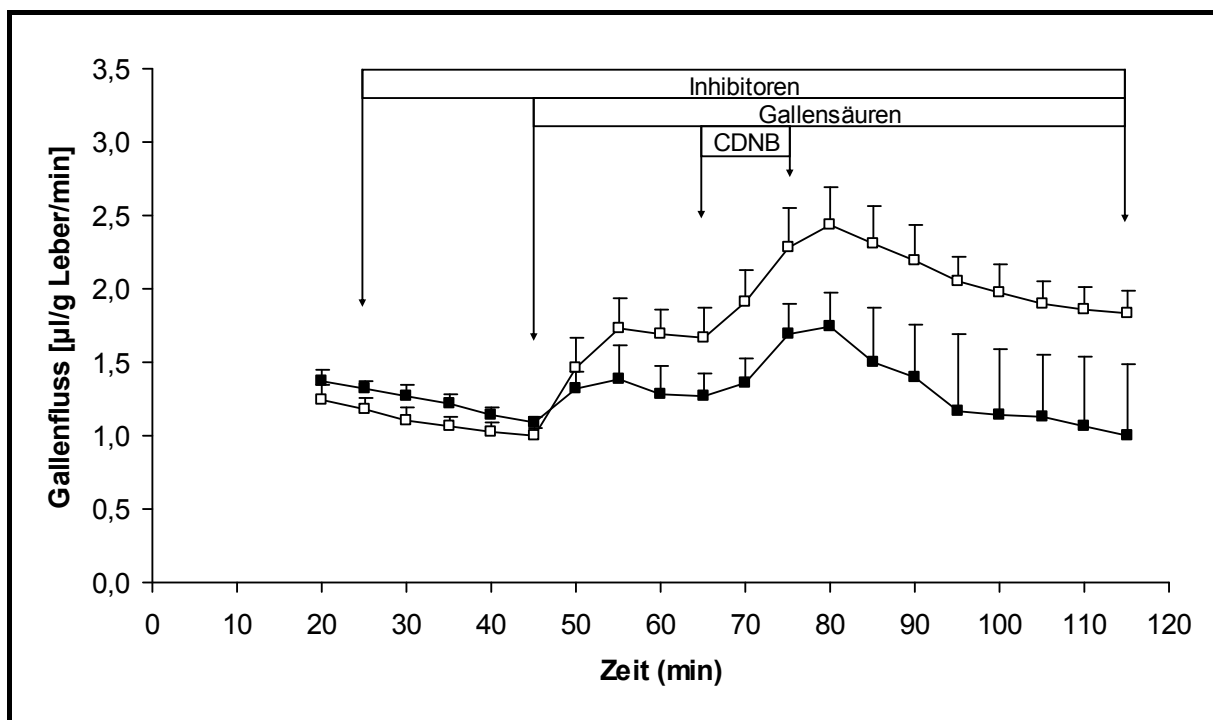


Abbildung 24: Vergleich des Gallenflusses unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von H89 + Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	C 1	C 3
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	DMSO	Gö6976 + H89
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	981,6 ± 79,3	675,0 ± 143,3

Tabelle 21: GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit und ohne Applikation von H89 + Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5, p<0,01, ANOVA)

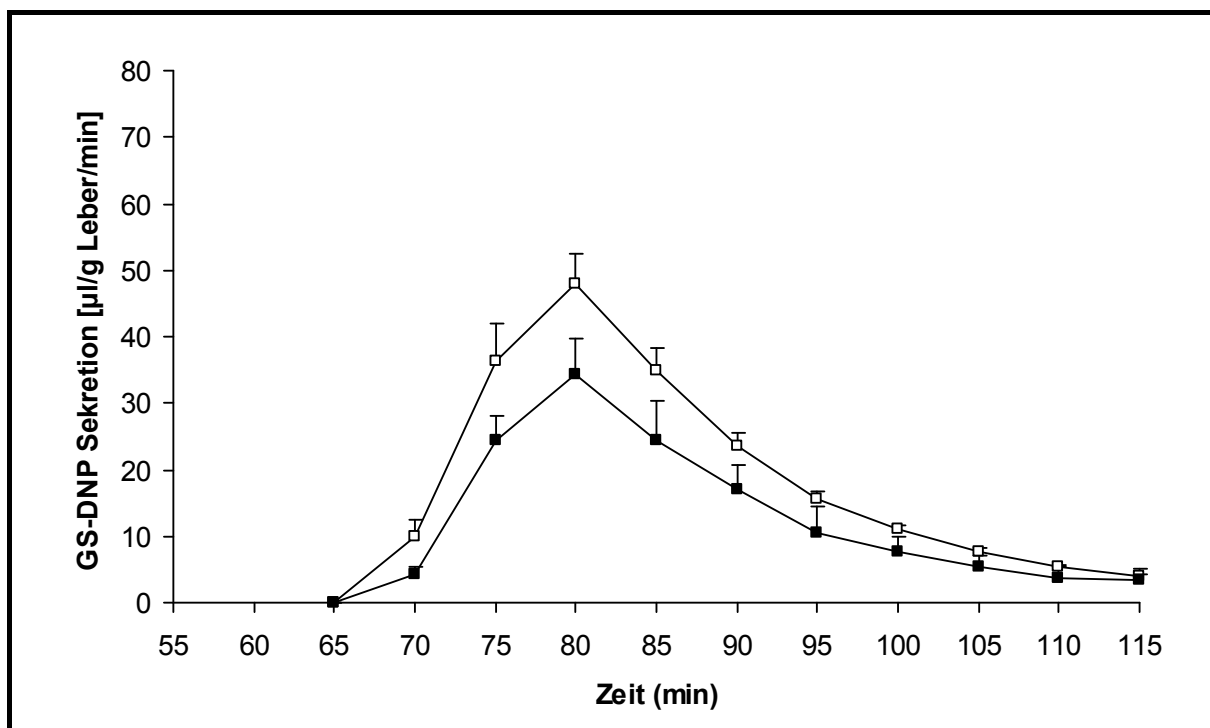


Abbildung 25: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) Applikation von H89 + Gö6976 (MW ± SD, n = 4-5)

3.1.2.4 Effekt von PKC-/PKA-Inhibitoren auf die anticholestatische Wirkung der TCA

Versuche unter gleichzeitiger Administration der Inhibitoren Staurosporin + H89 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TCA (Gruppe D 2) zeigten eine Tendenz zu einem geringfügig reduzierten Gallenfluß ($121,2 \pm 9,8$ vs. $104,1 \pm 12,4$ µl/g Leber/50min), wohingegen die GS-DNP-Sekretion ($1132,5 \pm 162,3$ vs. $813,1 \pm 83,0$ nmol/g Leber/50min, $p < 0,01$) hochsignifikant im Vergleich zur Kontrolle mit Gallensäuren alleine (Gruppe D 1) reduziert war (s. **Tabelle 23** und **Abbildung 26** für den Gallenfluß, **Tabelle 23** und **Abbildung 27** für die GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	D 1	D 2
Gallensäure	TLCA + TCA	TLCA + TCA
Inhibitor	DMSO	ST + H89
	Gallenfluß in µl/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	$121,2 \pm 9,8$	$104,1 \pm 12,4$

Tabelle 22: Gallenfluß unter TLCA + TCA mit und ohne Applikation von H89 + ST (MW ± SD, n = 4-5)

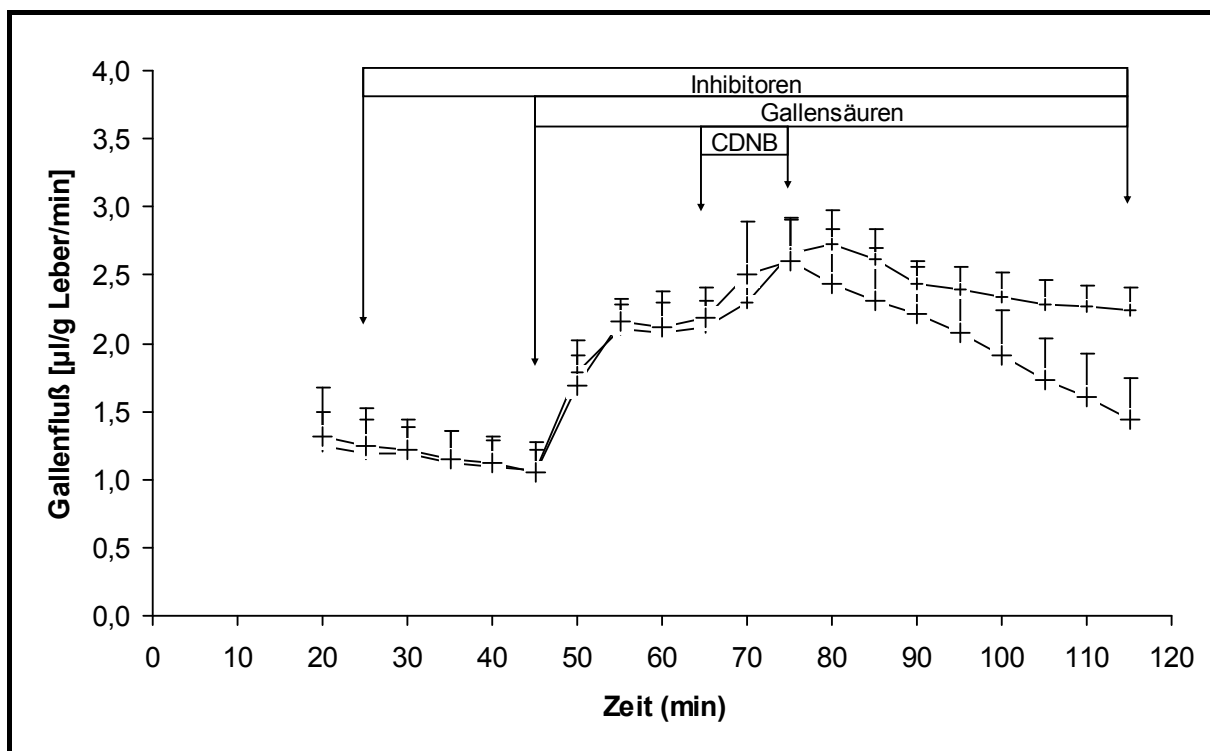


Abbildung 26: Vergleich des Gallenflusses unter TLCA + TCA mit (+) und ohne (+) Applikation von H89 + ST (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	D 1	D 2
Gallensäure	TLCA + TCA	TLCA + TCA
Inhibitor	DMSO	ST + H89
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min	
Σ (66.-115. min)	1132,5 ± 162,3	813,1 ± 83,0

Tabelle 23: GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TCA mit und ohne Applikation von ST + H89 (MW ± SD, n = 4)

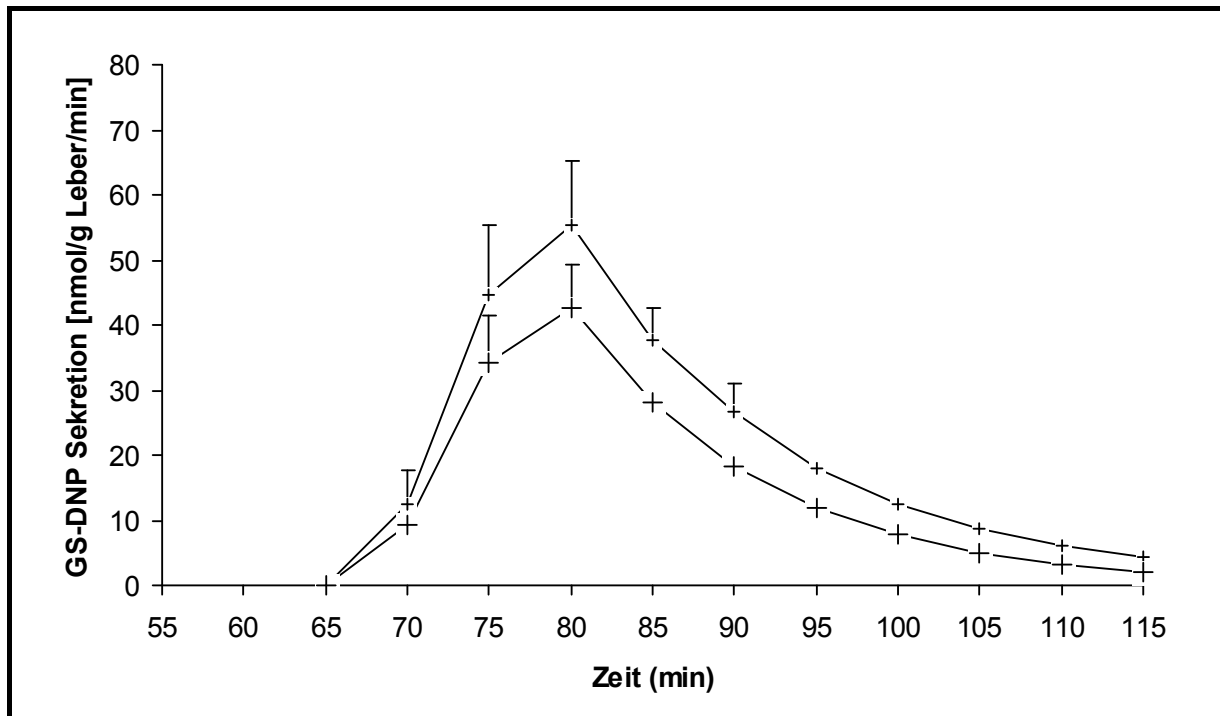


Abbildung 27: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TCA mit (+) und ohne (+) Applikation von H89 + ST (MW \pm SD, n = 4)

3.1.2.5 Einfluss von Gallensäuren und Enzyminhibitoren auf die hepatovenöse LDH-Freisetzung

Die Freisetzung von LDH aus der Leber in das Effluat diente in unseren Versuchen als Maß für die Schwere der Leberzellschädigung.

In nativen Lebern ohne Behandlung mit Gallensäuren oder Inhibitoren (Gruppe A 1) war die maximale hepatovenöse LDH-Freisetzung nach 115 min Versuchsdauer mit $2,29 \pm 1,19$ mU/min/g sehr gering.

Unter Infusion von TLCA (Gruppe B 1) stieg die LDH-Freisetzung als Zeichen des hepatotoxischen Effekts dieser Gallensäure deutlich auf das 32fache des Ausgangswertes ($73,1 \pm 31,7$ vs. $2,3 \pm 1,2$ mU/min/g). Gleichzeitige Infusion der protektiven TUDCA (Gruppe C 1) reduzierte die LDH-Freisetzung wieder auf das 9fache ($21,3 \pm 7,3$ vs. $2,3 \pm 1,2$ mU/min/g) des Ausgangswertes. Nur gleichzeitige Infusion von H89 + ST zusätzlich zu TLCA + TUDCA antagonisierte diese Wirkung der TUDCA und verursachte einen signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung gegenüber Kontrollen mit TLCA + TUDCA alleine ($21,3 \pm 7,3$ vs. $95,3 \pm 24,7$ mU/min/g, $p < 0,05$). In Versuchen mit DMSO, TLCA oder TUDCA alleine war die

LDH-Freisetzung nicht signifikant von der Administration von H89 + ST beeinflusst (s. **Tabelle 24** und **Abbildung 28**).

Gruppe	Gallensäure	Inhibitor	LDH-Freisetzung (mU/g Leber/min)
A 1	DMSO	DMSO	2,3 ± 1,2
A 2	DMSO	ST + H89	4,0 ± 5,1
B 1	TLCA	DMSO	73,1 ± 31,7
B 2	TLCA	ST + H89	61,3 ± 29,3
C 1	TLCA + TUDCA	DMSO	21,3 ± 7,3
C 2	TLCA + TUDCA	ST + H89	95,3 ± 24,7 [§]
C 3	TLCA + TUDCA	Gö6976 + H89	64,1 ± 53,5
C 4	TLCA + TUDCA	Gö6976	40,5 ± 43,3
C 5	TLCA + TUDCA	ST	71,8 ± 34,2
C 6	TLCA + TUDCA	H89	39,3 ± 7,2
D 1	TLCA + TCA	DMSO	22,4 ± 5,3
D 2	TLCA + TCA	ST + H89	65,3 ± 52,0
E 1	TUDCA	DMSO	11,4 ± 4,4
E 2	TUDCA	ST + H89	11,7 ± 6,8

Tabelle 24: Einfluss von Gallensäuren und Enzyminhibitoren auf die hepatozelluläre LDH-Freisetzung nach 115 Minuten Perfusionszeit (MW ± SD, n = 4-5, [§] p<0,05 vs. TLCA + TUDCA)

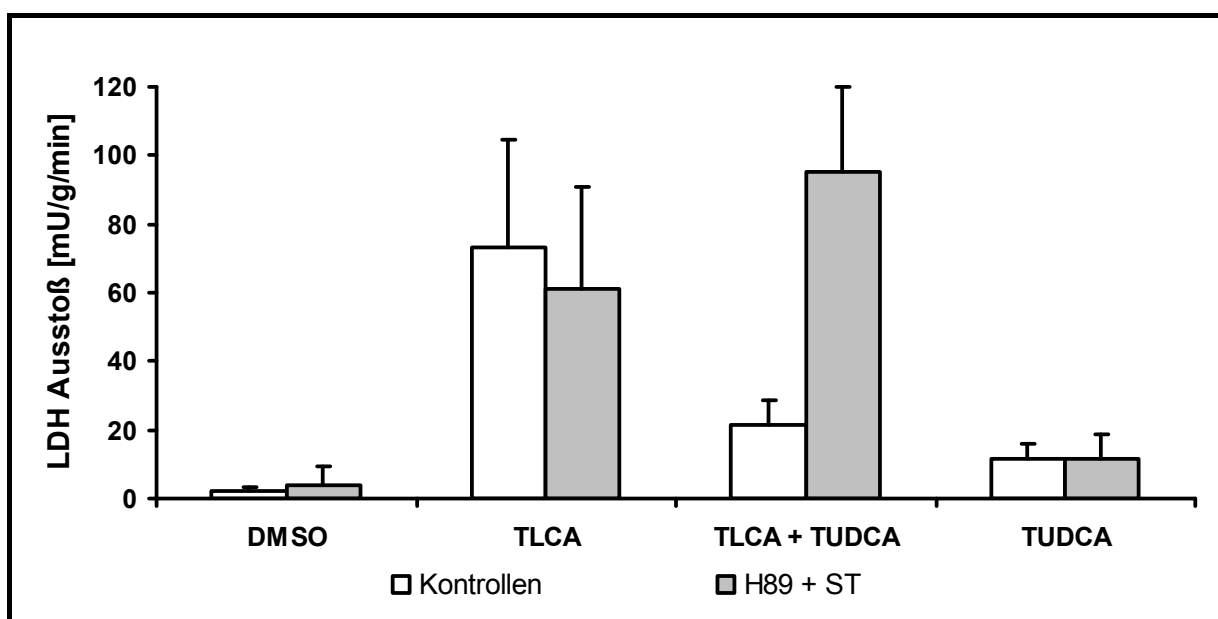


Abbildung 28: Einfluss von Gallensäuren und H89 + ST auf die hepatovenöse LDH-Freisetzung nach 115 Minuten Perfusionszeit (MW ± SD, n = 4-5)

3.1.2.6 Einfluss von Gallensäuren und Enzyminhibitoren auf die PKA-Aktivität

Um Hinweise auf den Aktivierungsgrad des PKA-Signalwegs zu erhalten, wurden im Lebergewebe der Perfusionsversuche die cAMP-Konzentration und der Phosphorylierungsgrad des PKA-Substrats CREB per EIA bzw. per Western Blot bestimmt (s. **Kap. 2.1.5**). Hepatozelluläre cAMP-Konzentration ebenso wie Phosphorylierung von CREB erwiesen sich dabei als von den verwendeten Gallensäuren unabhängig. In Versuchen ohne Gallensäuren jedoch war die Phosphorylierung von CREB unter Hemmung der PKA mit ST + H89 signifikant reduziert ($0,52 \pm 0,07$ vs. $0,25 \pm 0,04$ AE, $p < 0,001$) (s. **Tabelle 25** und **Abbildung 29** und **Abbildung 30**).

Gruppe	Gallensäure	Inhibitor	cAMP [pmol/g Leber]	P-CREB [AE]
A 1	DMSO	DMSO	$30,6 \pm 3,5$	$0,52 \pm 0,07$
A 2	DMSO	ST + H89	$30,1 \pm 10,6$	$0,25 \pm 0,04^{\S}$
E 1	TUDCA	DMSO	$24,9 \pm 7,7$	$0,37 \pm 0,15$
E 2	TUDCA	ST + H89	$29,6 \pm 7,4$	$0,26 \pm 0,11$
B 1	TLCA	DMSO	$30,8 \pm 8,7$	$0,34 \pm 0,11$
B 2	TLCA	ST + H89	$36,6 \pm 3,3$	$0,22 \pm 0,07$
C 1	TLCA + TUDCA	DMSO	$31,7 \pm 6,5$	$0,36 \pm 0,22$
C 2	TLCA + TUDCA	ST + H89	$39,5 \pm 14,0$	$0,32 \pm 0,14$

Tabelle 25: cAMP-Konzentrationen in pmol/g Leber und phosphoryliertes CREB in arbiträren Einheiten (AE) in Lebergewebe aus Perfusionsversuchen mit und ohne ST + H89 (MW \pm SD, n = 4-5, $^{\S}p < 0,001$ vs. DMSO, ANOVA)

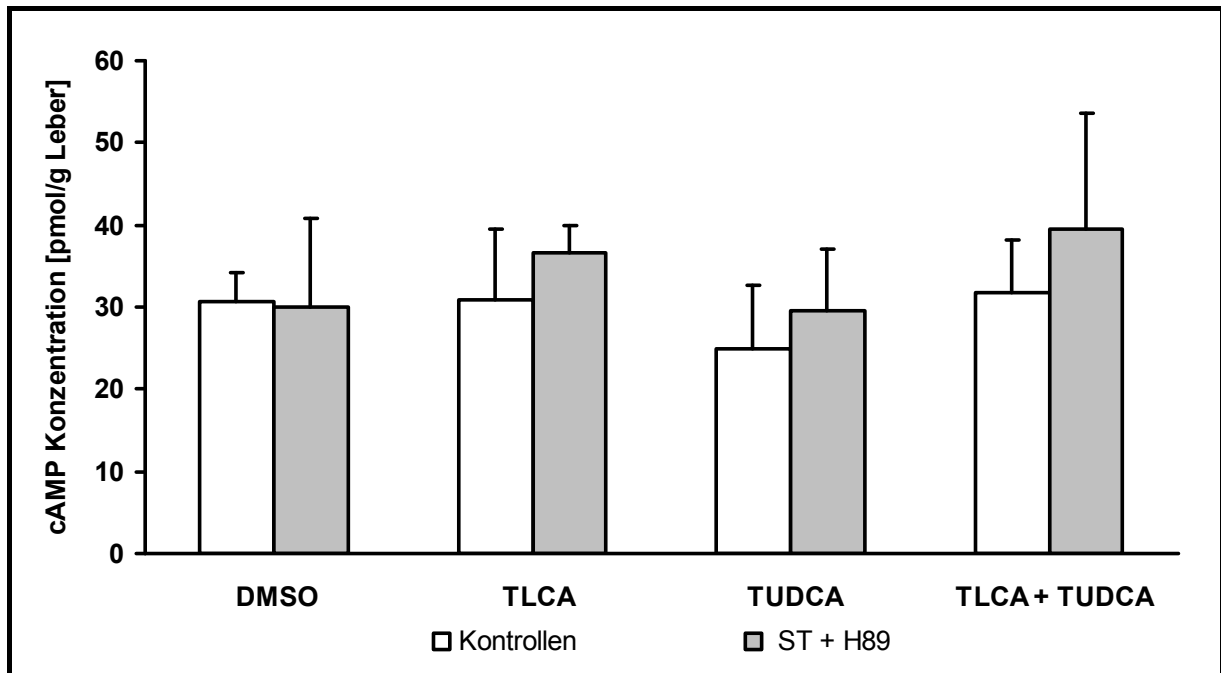


Abbildung 29: cAMP-Konzentration in Lebergewebe aus Perfusionsversuchen mit und ohne H89 + ST (MW \pm SD, n = 4-5)

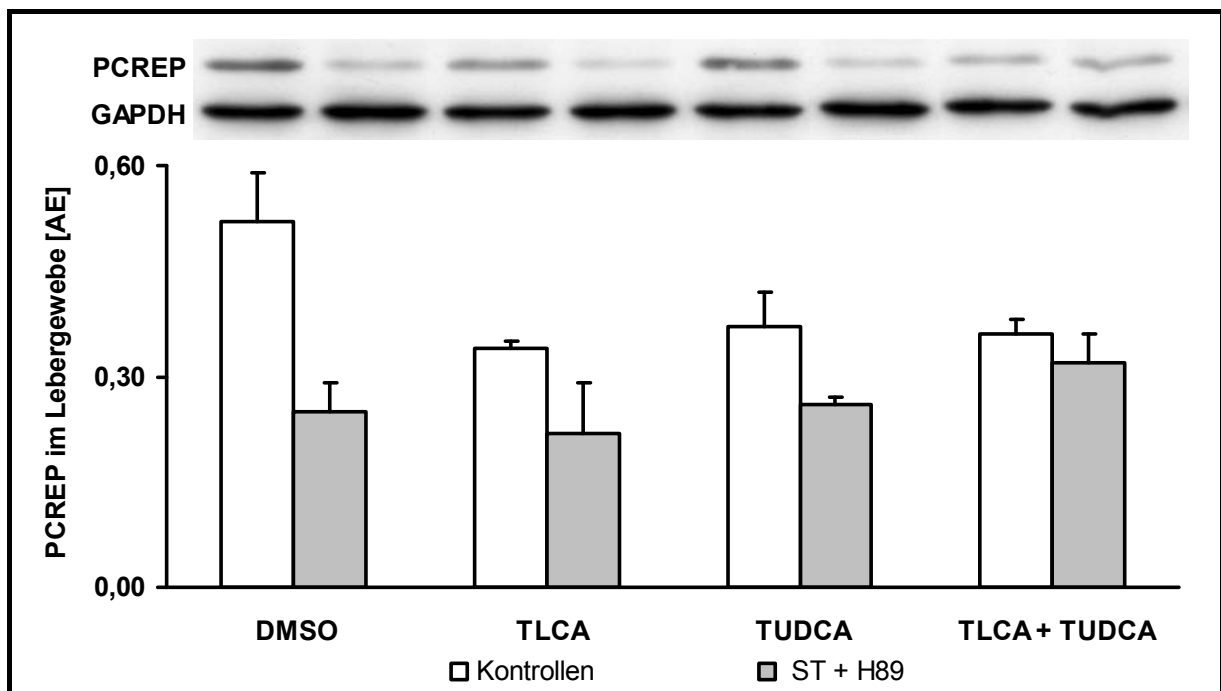


Abbildung 30: PCREB in arbiträren Einheiten (AE) in Lebergewebe aus Perfusionsversuchen mit und ohne H89 + ST (MW \pm SD, n = 4-5) mit Ausschnitt eines repräsentativen Western Blots

3.1.3 *In vitro* Phosphorylierung von MRP2 durch cPKC α , nPKC ϵ und PKA

Humanes MRP2 wurde aus HepG2-Zellen präzipitiert und durch aktivierte rekombinante cPKC α , nPKC ϵ und PKA *in vitro* phosphoryliert (s. **Kap. 2.3**). Der MRP2 Komplex wurde sowohl durch cPKC α und nPKC ϵ als auch durch PKA phosphoryliert. Unter gleichzeitigem Einsatz von cPKC α und nPKC ϵ schien dabei ein höherer Phosphorylierungsgrad erreicht zu werden als unter Inkubation mit cPKC α oder nPKC ϵ alleine. Staurosporin hemmte effektiv die Phosphorylierung durch die getesteten Enzyme (s. **Tabelle 26** und **Abbildung 31**).

Enzym	Inhibitor	MRP2 Umsatz [fmol/min]
PKA	DMSO	2,6 ± 0,4
PKA	ST	0,3 ± 0,1
cPKC α	DMSO	19,1 ± 2,8
cPKC α	ST	5,0 ± 2,4
nPKC ϵ	DMSO	14,5 ± 3,0
nPKC ϵ	ST	1,9 ± 1,2
cPKC α + nPKC ϵ	DMSO	26,9 ± 8,3
cPKC α + nPKC ϵ	ST	6,4 ± 2,0

Tabelle 26: Phosphorylierung von MRP2 durch rekombinante cPKC α , nPKC ϵ und PKA (MW ± SD, n = 4)

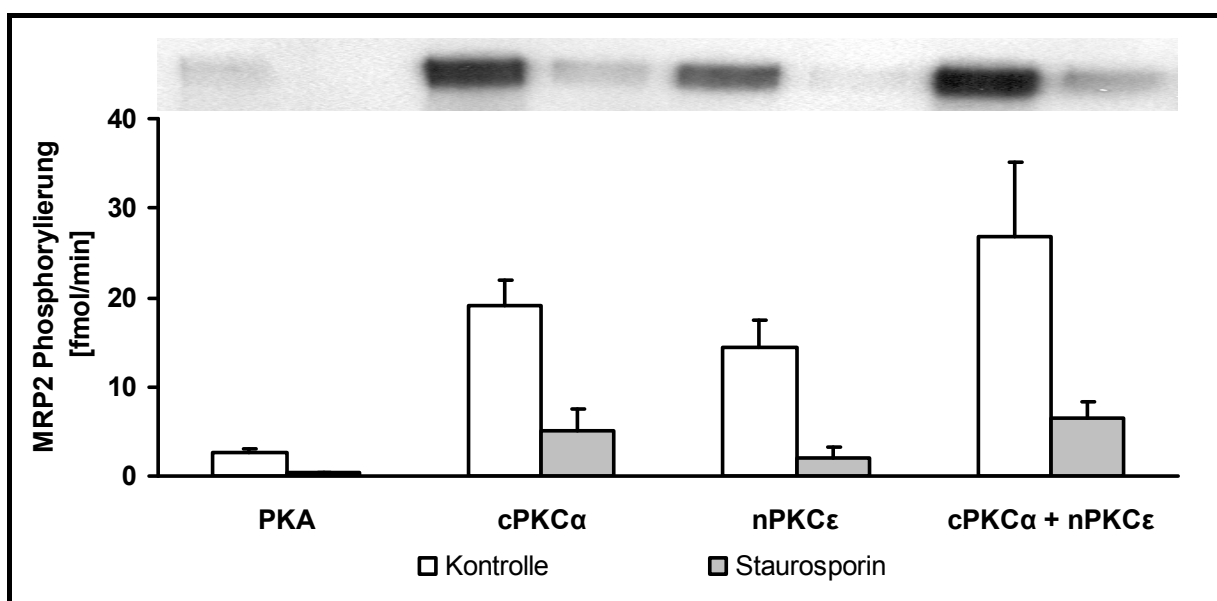


Abbildung 31: Phosphorylierung von MRP2 durch rekombinante cPKC α , nPKC ϵ und PKA (MW ± SD, n = 4) mit Ausschnitt eines repräsentativen Western Blots

3.1.4 Dichte des Transportproteins MRP2 in der Membran von HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mit Gallensäuren und cAMP als Positivkontrolle stimuliert. Anschließend wurde mit Hilfe der Biotinylierungstechnik die Dichte des Transportproteins MRP2 an der hepatozellulären Membran bestimmt (s. **Kap. 2.5.5**).

3.1.4.1 Apikale Transporterdichte nach Stimulation mit Gallensäuren oder cAMP

Für die Auswertung wurden nur jene Versuche herangezogen, die unter der Positivkontrolle mit cAMP eine Erhöhung der membranären MRP2 Dichte zeigten und als Beleg für die Spezifität der Biotinylierung keine Spuren des obligat intrazellulären Proteins GAPDH im biotinylierten Präzipitat aufwiesen („Negativkontrolle“). TLCA führte in diesen Versuchen zu einem tendenziellen Abfall des membranständigen Anteils von MRP2 von $27,0 \pm 7,6$ % unter Kontrollen auf $22,7 \pm 5,9$ %. Gleichzeitige Gabe von TUDCA hob diesen Effekt auf und erhöhte den membranären MRP2 Anteil auf $34,5 \pm 17,0$ %. Alleinige Gabe von TUDCA in nicht mit TLCA behandelten Zellen führte zu einer deutlichen Steigerung der MRP2 Dichte auf $37,0 \pm 17,9$ % (s. **Tabelle 27** und **Abbildung 32** **Abbildung 33**).

Versuchsbedingung	Membranärer MRP2 Anteil in %
DMSO 1 %	$27,0 \pm 7,6$
TLCA 50 μ M	$22,7 \pm 5,9$
TUDCA 50 μ M	$37,0 \pm 17,9$
TLCA 50 μ M + TUDCA 50 μ M	$34,5 \pm 17,0$
cAMP 10 μ M	$35,9 \pm 3,3$

Tabelle 27: Membranbindung von MRP2 in % (MW \pm SD, n = 5)

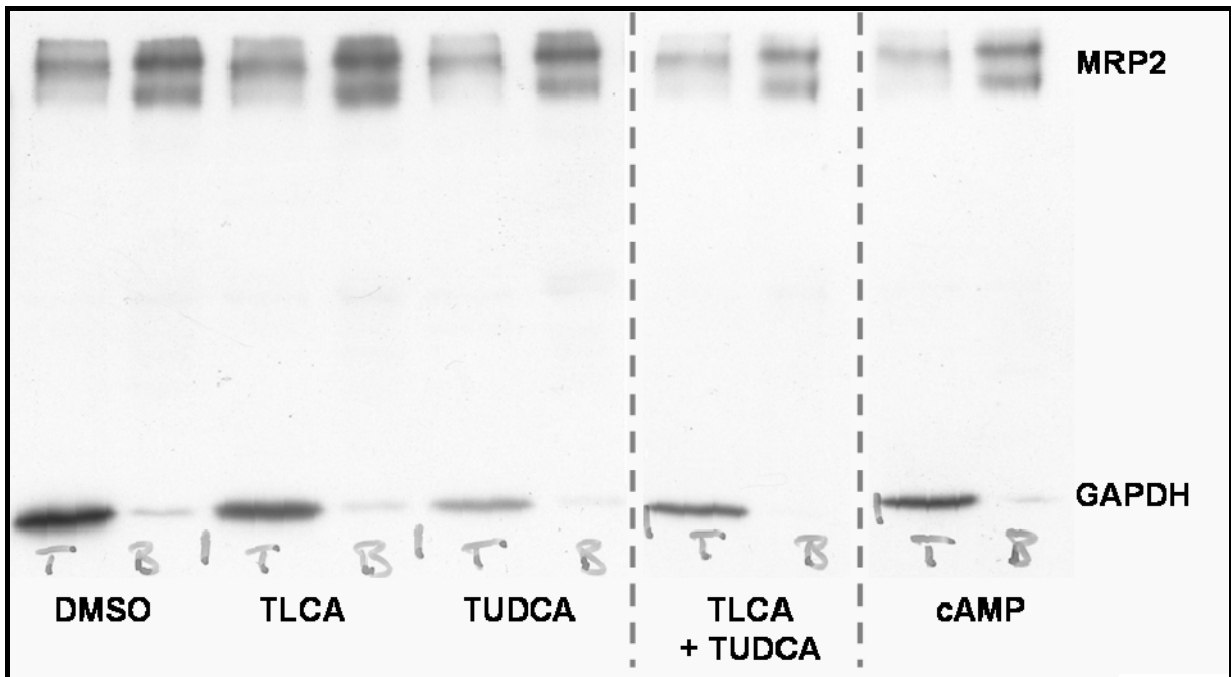


Abbildung 32: Zusammenschnitt repräsentativer Western Blots eines Biotinylierungsversuches (T = Gesamtlysate, B = Präzipitate der jeweiligen Probe)

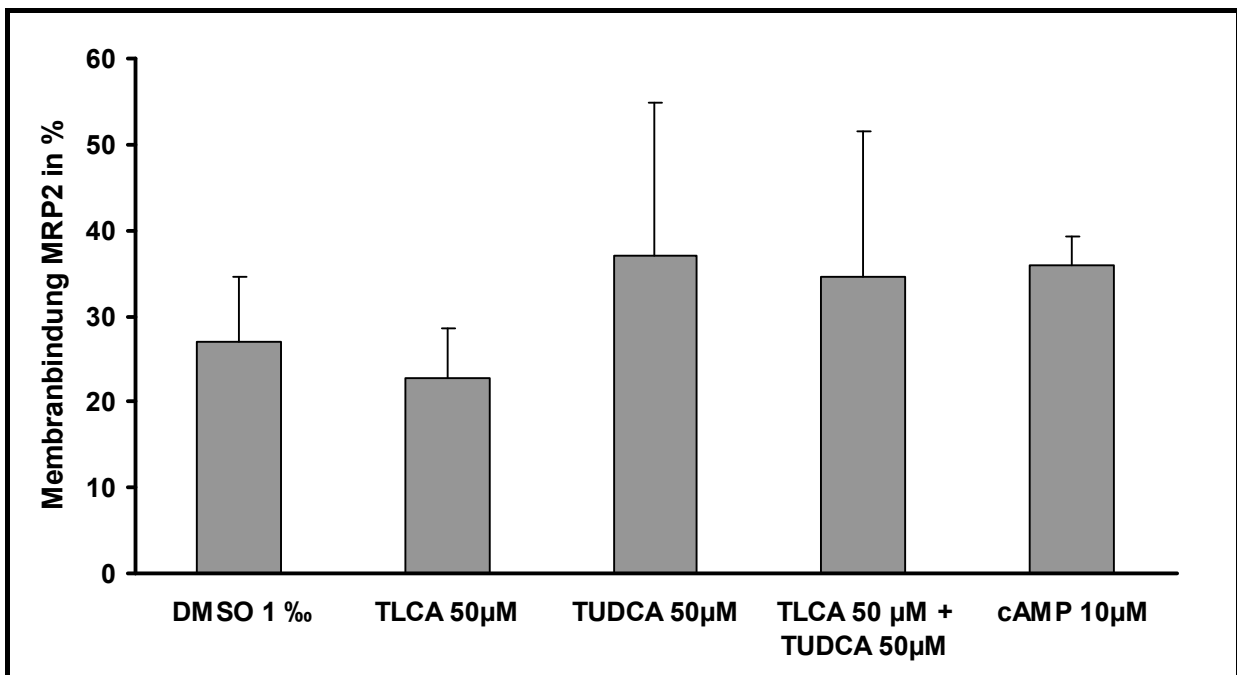


Abbildung 33: Membranbindung von MRP2 in % (MW ± SD, n = 5)

3.1.4.2 Grenzen des Modells

Mit dem hier gewählten Versuchsprotokoll reagierten die Zellen, trotz zahlreicher Modifikationen, nur in einem von fünf Versuchen wie erwartet auf die Stimulation mit der Positivkontrolle cAMP und fiel gleichzeitig der Nachweis von GAPDH in der Präzipitation negativ aus, wobei die größere Schwierigkeit in der Einhaltung dieser „Negativkontrolle“ lag. Wir konnten daher eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch Biotinylierung von Transportproteinen aus dem intrazellulären Reservepool langfristig nicht zufrieden stellend ausschließen und mussten unsere Bemühungen trotz der hier gezeigten viel versprechenden Zwischenergebnisse einstellen.

3.2 Bedeutung von MAPK für die anticholestatische Wirkung von TUDCA bei TLCA-induzierter Cholestase

In isoliert perfundierten Rattenlebern wurde durch Infusion von TLCA eine Cholestase induziert, die durch Koadministration der hydrophilen Gallensäure TUDCA aufgehoben wurde. Durch zusätzliche, gleichzeitige Infusion von Inhibitoren der MAP-Kinasen Erk1/2 und/oder p38 wurde die Abhängigkeit der anticholestatischen Wirkung der TUDCA von diesen Signalmediatoren überprüft.

Rattenlebern wurden dazu isoliert über 100 min mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Ab der 25. Minute erfolgte die Zugabe von Inhibitoren der MAP-Kinasen und ab der 30. Minute die Zugabe von TLCA und/oder TUDCA bzw. der Trägersubstanz DMSO zum Perfusionsmedium. Zwischen der 50. und 60. min wurde zusätzlich das Modellanion CDNB infundiert, um die Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 erfassen zu können.

3.2.1 Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion unter Kontrollbedingungen

Es wurden 2 Sets von Kontrollversuchen angefertigt. Im ersten Set wurde die Trägersubstanz des später getesteten Inhibitors des Erk1/2-Signalwegs (PD 98 095) DMSO zusätzlich zu den Gallensäuren infundiert (s. **Tabelle 28** und **Abbildung 34** für den Gallenfluß, **Tabelle 29** und **Abbildung 35** für die GS-DNP-Sekretion). Im

zweiten Set wurde das inaktive Analogon SB 202 474 des später verwendeten Inhibitors der p38^{MAPK} SB 202 190 in 100 bzw. 500 nanomolarer Konzentration verwendet (s. **Tabelle 30** und **Abbildung 36** für den Gallenfluß, **Tabelle 31** und **Abbildung 37** für die GS-DNP-Sekretion).

In beiden Sets sank unter Applikation der hydrophoben Gallensäure TLCA sowohl der Gallenfluß als auch die GS-DNP-Sekretion dramatisch im Vergleich zu Versuchen mit dem Gallensäureträger DMSO ab, es kam zur Cholestase.

Zusätzliche Gabe von TUDCA antagonisierte die durch TLCA induzierte Cholestase und verbesserte signifikant Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion. Alleinige Behandlung primär nicht-cholestatischer Lebern mit TUDCA hob den Gallenfluß deutlich über das Ausgangsniveau, sie induzierte eine Choleresese.

Gruppe	a 1	b 1	c 1	d 1
Gallensäure	DMSO	TLCA	TLCA + TUDCA	TUDCA
Inhibitor	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Gallenfluß in µl/g Leber/min				
Σ (51.-100. min)	42,7 ± 15,8	1,4 ± 0,5	31,5 ± 18,5	63,8 ± 8,8

Tabelle 28: Gallenfluß unter DMSO, TLCA, TUDCA und TLCA + TUDCA in Kontrollversuchen ohne Verwendung des Inhibitors der Erk1/2-Aktivierung PD 98 059 (MW±SD,n=4-5)

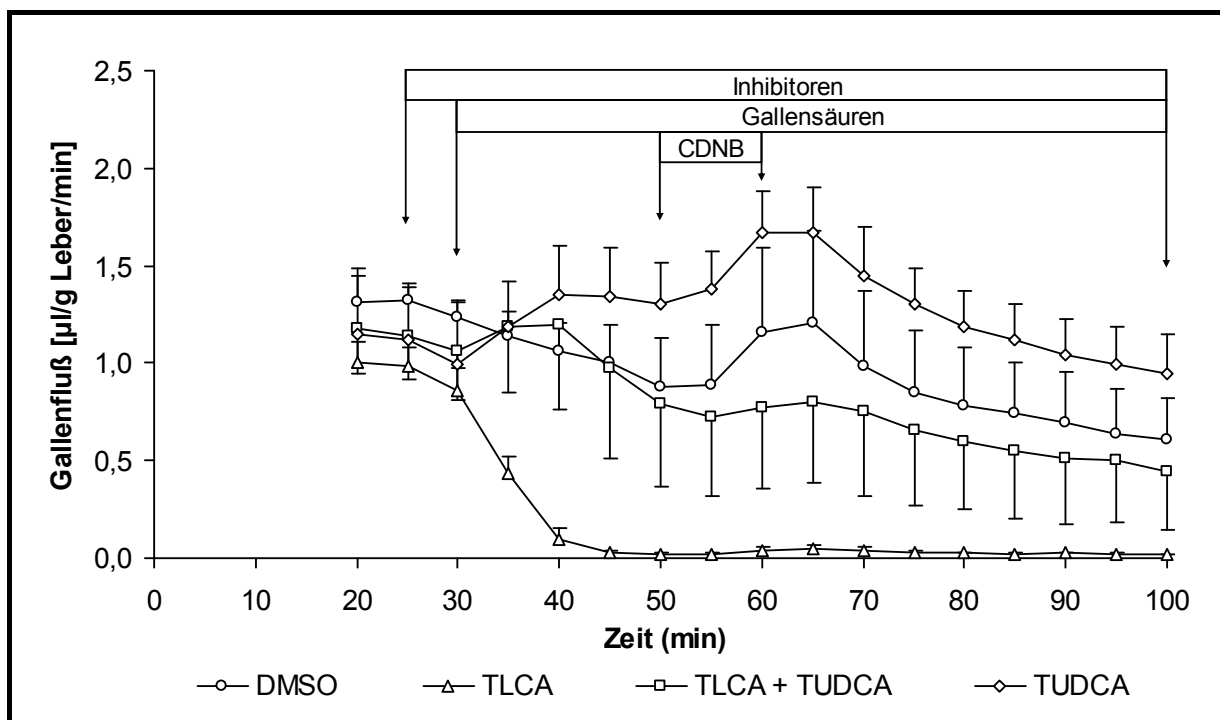


Abbildung 34: Vergleich des Gallenflusses unter DMSO, TLCA, TUDCA und TLCA + TUDCA in Kontrollversuchen ohne Verwendung des Inhibitors der Erk1/2-Aktivierung PD 98 059 (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	a 1	b 1	c 1	d 1
Gallensäure	DMSO	TLCA	TLCA + TUDCA	TUDCA
Inhibitor	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min				
Σ (51.-100. min)	505,7 ± 168,4	4,4 ± 5,6	167,7 ± 93,6	658,7 ± 168,6

Tabelle 29: GS-DNP-Sekretion unter DMSO, TLCA, TUDCA und TLCA + TUDCA in Kontrollversuchen ohne Verwendung des Inhibitors der Erk1/2-Aktivierung PD 98 059 (MW ± SD, n = 4-5)

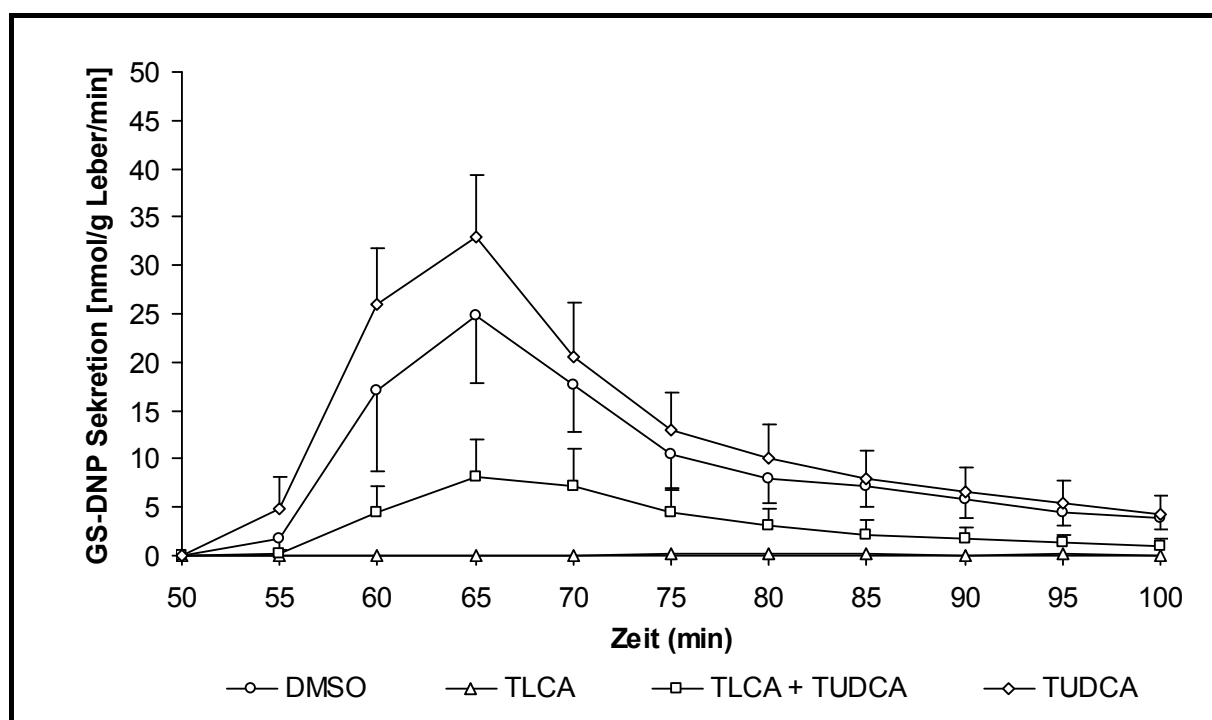


Abbildung 35: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter DMSO, TLCA, TLCA + TUDCA und TUDCA in Kontrollversuchen ohne Verwendung des Inhibitors der Erk1/2-Aktivierung PD 98 059 (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	a 3	b 3	c 3	c 5	d 3
Gallensäure	DMSO	TLCA	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA	TUDCA
Inhibitor	SB 202 474	SB 202 474	SB 202 474	SB 202 474 500 nmol/l	SB 202 474
Gallenfluß in µl/g Leber/min					
Σ (51.-100. min)	65,3 ± 5,3	2,0 ± 0,7	84,6 ± 9,0	67,9 ± 19,3	102,1 ± 2,4

Tabelle 30: Gallenfluß unter DMSO, TLCA, TUDCA und TLCA + TUDCA in Kontrollversuchen unter Verwendung des *inaktiven* p38^{MAPK}-Inhibitors SB 202 474 (MW ± SD, n = 4-5)

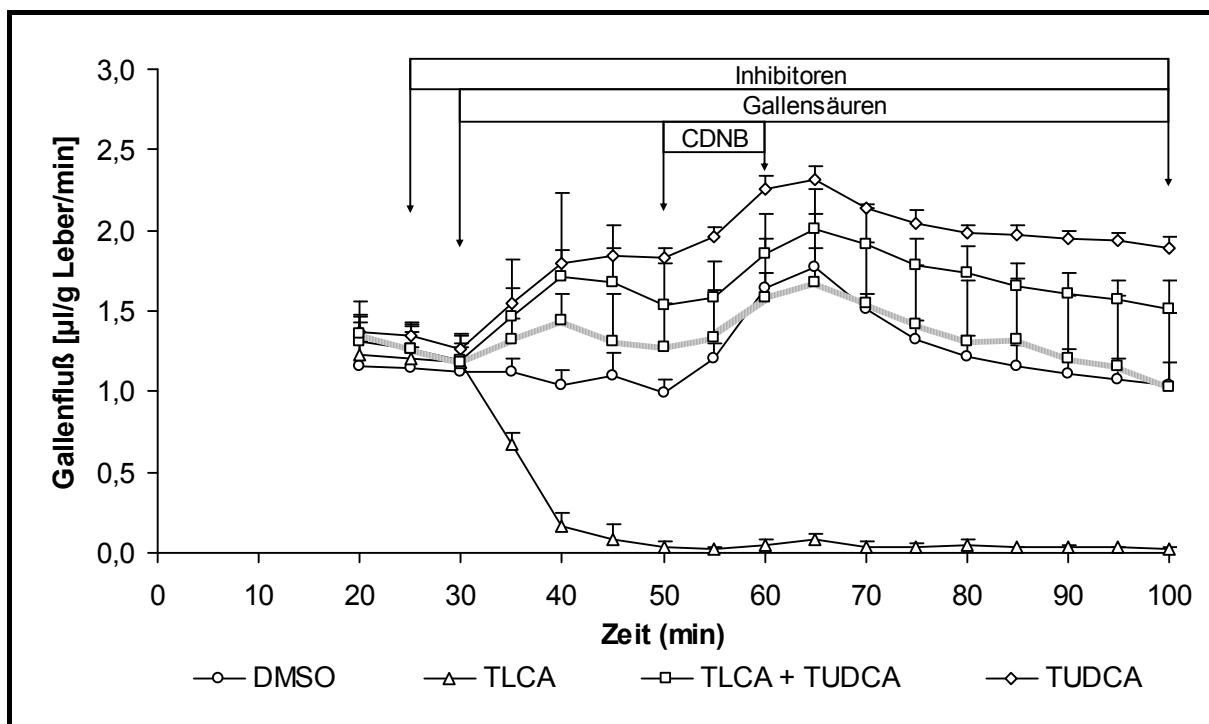


Abbildung 36: Vergleich des Gallenflusses unter DMSO, TLCA, TUDCA und TLCA + TUDCA in Kontrollversuchen unter Verwendung des *inaktiven* p38^{MAPK}-Inhibitors SB 202 474 in 100 nmol/l (durchgezogene Linien) bzw. 500 nmol/l (gestrichelte Linie) (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	a 3	b 3	c 3	c 5	d 3
Gallensäure	DMSO	TLCA	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA	TUDCA
Inhibitor	SB 202 474	SB 202 474	SB 202 474	SB 202 474 500 nmol/l	SB 202 474
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min				
Σ (51.-100. min)	840,7 ± 48,1	22,3 ± 17,9	493,2 ± 141,9	472,6 ± 93,4	797,5 ± 75,6

Tabelle 31: GS-DNP-Sekretion unter DMSO, TLCA, TUDCA und TLCA + TUDCA in Kontrollversuchen unter Verwendung des *inaktiven* p38^{MAPK}-Inhibitors SB 202 474 (MW ± SD, n = 4-5)

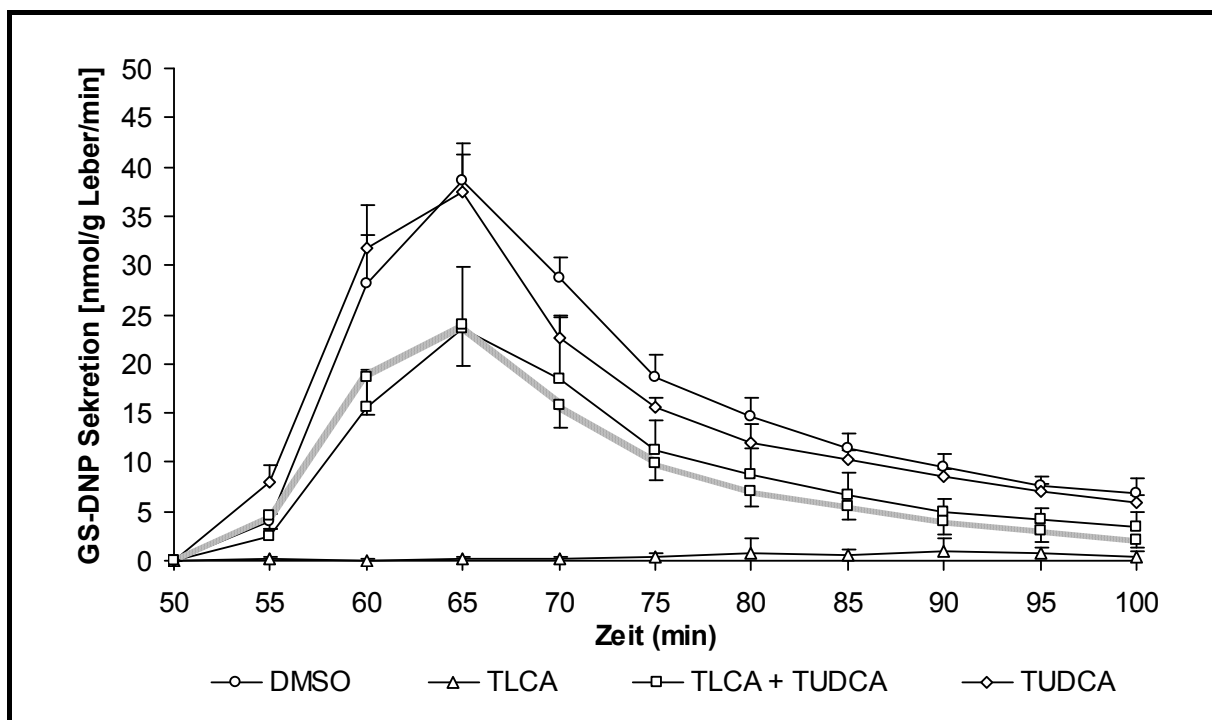


Abbildung 37: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter DMSO, TLCA, TUDCA und TLCA + TUDCA in Kontrollversuchen unter Verwendung des *inaktiven* p38^{MAPK}-Inhibitors SB 202 474 in 100 nmol/l (durchgezogene Linien) bzw. 500 nmol/l (gestrichelte Linie) (MW ± SD, n = 4-5)

3.2.2 Effekt der aktiven MAPK-Inhibitoren unter DMSO und TLCA

Inhibition des Erk1/2-Signalweges durch 5 µmol/l PD 98 095 oder der p38^{MAPK} durch 100 nmol/l SB 202 190 hatte weder unter Basalbedingungen ohne Infusion von Gallensäuren (Gruppen a) Einfluss auf den Gallenfluß (s. **Tabelle 32** und **Abbildung 38**) oder die GS-DNP-Sekretion (s. **Tabelle 33** und **Abbildung 39**), noch behinderten sie die Entwicklung einer Cholestase unter TLCA (Gruppen b).

Gruppe	a 2	b 2	a 4	b 4
Gallensäure	DMSO	TLCA	DMSO	TLCA
Inhibitor	PD 98 059	PD 98 059	SB 202 190	SB 202 190
	Gallenfluß in µl/g Leber/min			
Σ (51.-100. min)	48,9 ± 13,7	2,5 ± 2,1	59,1 ± 6,2	3,20 ± 0,9

Tabelle 32: Gallenfluß unter DMSO und TLCA bei gleichzeitiger Applikation von PD 98 059 oder SB 202 190 (MW ± SD, n = 3-4)

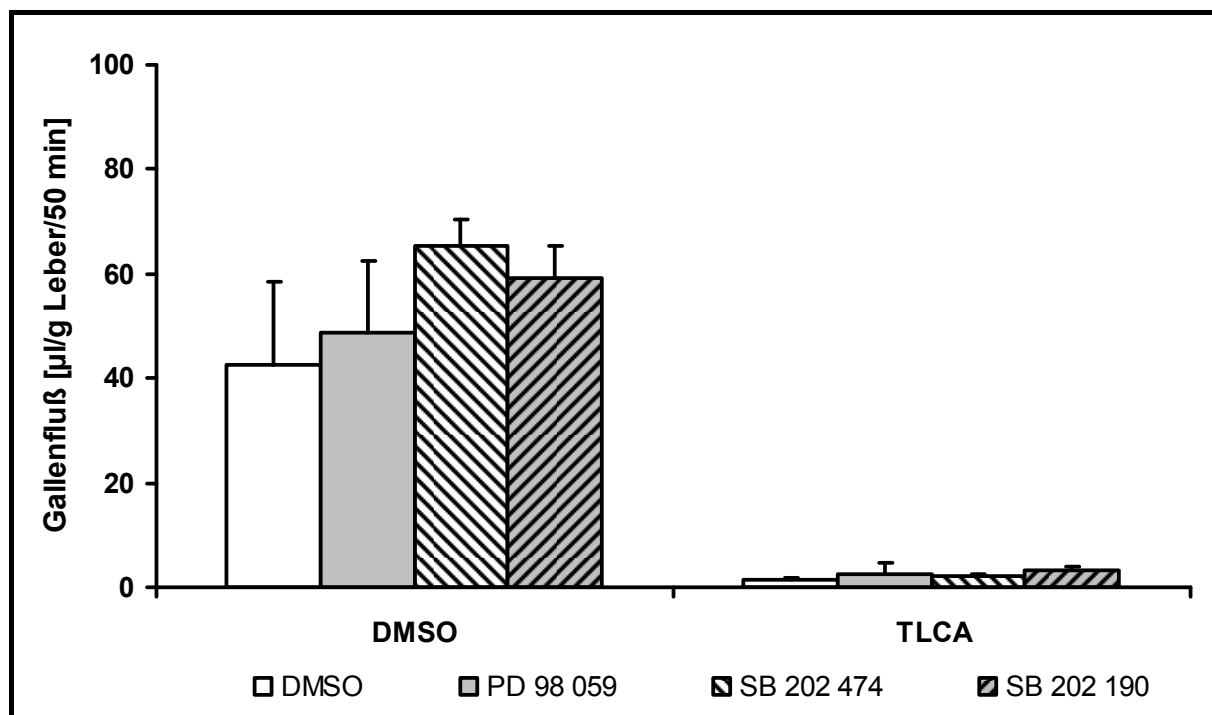


Abbildung 38: Vergleich des kumulativen Gallenflusses über die letzten 50 min der Versuche unter DMSO bzw. TLCA mit (■, ▨) und ohne (□, ▩) Inhibition der MAP-Kinasen p38 und Erk1/2 (MW ± SD, n = 3-4)

Gruppe	a 2	b 2	a 4	b 4
Gallensäure	DMSO	TLCA	DMSO	TLCA
Inhibitor	PD 98 059	PD 98 059	SB 202 190	SB 202 190
GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min				
Σ (51.-100. min)	602,7 ± 69,4	7,3 ± 11,5	804,8 ± 97,7	54,9 ± 27,3

Tabelle 33: GS-DNP-Sekretion unter DMSO und TLCA bei gleichzeitiger Applikation von PD 98 095 oder SB 202 190 (MW ± SD, n = 3-4)

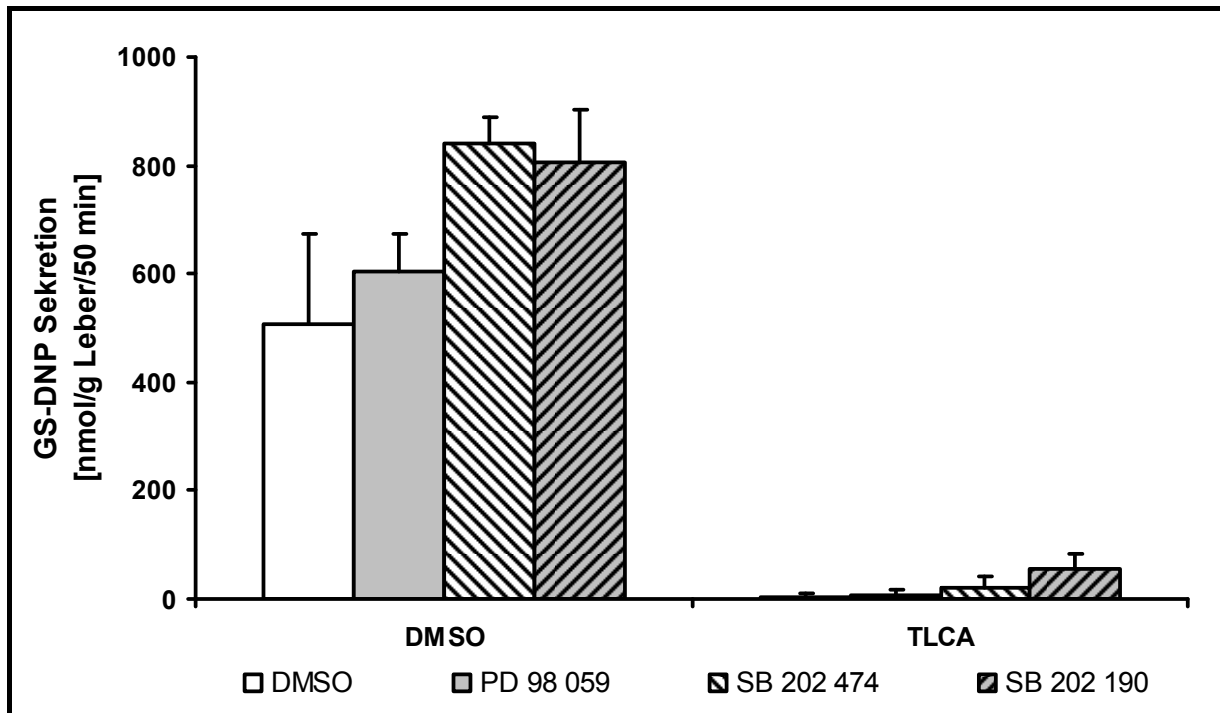


Abbildung 39: Vergleich der kumulativen GS-DNP-Sekretion über die letzten 50 min der Versuche unter DMSO bzw. TLCA mit (■, ▨) und ohne (□, ▩) Inhibition der MAP-Kinasen p38 und Erk1/2 (MW ± SD, n = 3-4)

3.2.3 Effekt der MAPK-Inhibitoren auf die anticholestatische und choloretische Wirkung der TUDCA

3.2.3.1 Effekt des p38^{MAPK}-Inhibitors SB 202 190

Inhibition der p38^{MAPK} durch Applikation des aktiven Inhibitors SB 202 190 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TUDCA bzw. zu TUDCA alleine hatte weder in 100- noch in 500 nanomolarer Inhibitorkonzentration signifikanten Einfluss auf Gallenfluß oder GS-DNP-Sekretion, behinderte also weder den anticholestatischen noch den choloretischen Effekt der TUDCA (s. **Tabelle 34** und **Abbildung 40** für den Gallenfluß, **Tabelle 35** und **Abbildung 41** für die GS-DNP-Sekretion).

Gruppe	c 3	c 4	c 5	c 6	d 3	d 4
Gallensäure	TLCA + TUDCA			TUDCA		
Inhibitor	SB 202 474	SB 202 190	SB 202 474 500 nmol/l	SB 202 190 500 nmol/l	SB 202 474	SB 202 190
Gallenfluß in µl/g Leber/min						
Σ (51.-100. min)	84,6 ± 9,0	84,0 ± 9,3	67,9 ± 19,3	61,9 ± 12,0	102,1 ± 2,4	93,8 ± 10,4

Tabelle 34: Gallenfluß unter TUDCA alleine und unter TLCA + TUDCA mit (SB 202 190) und ohne (SB 202 474) Inhibition der p38^{MAPK} (MW ± SD, n = 3-6)

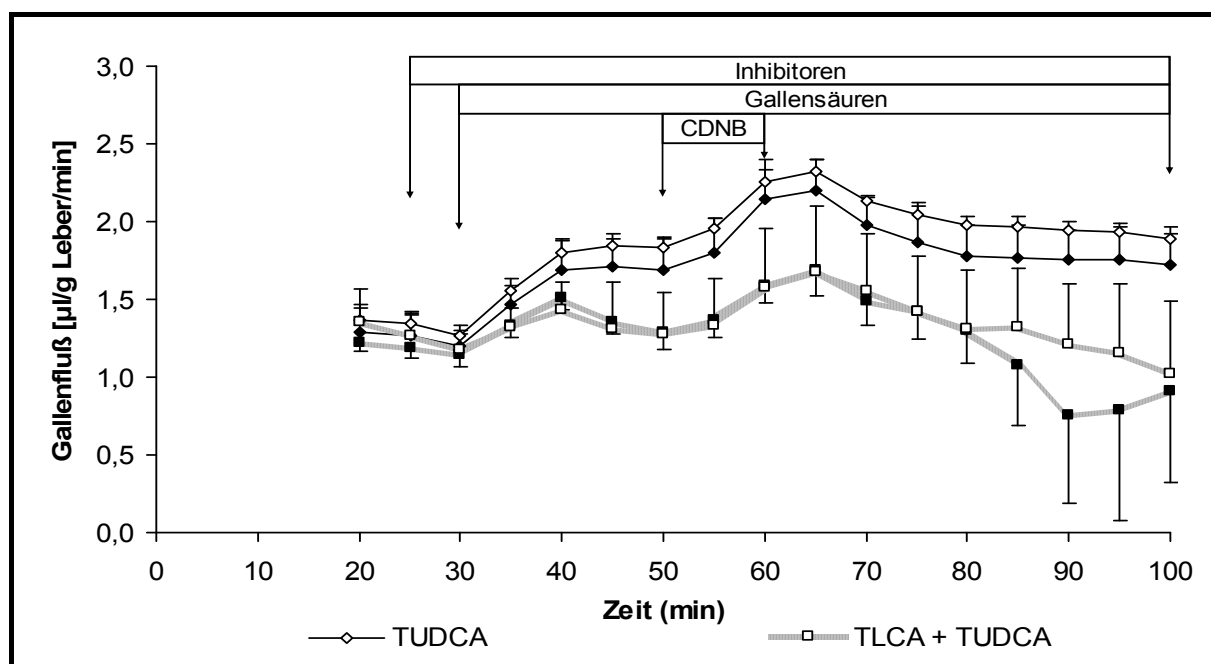


Abbildung 40: Vergleich des Gallenflusses unter TUDCA alleine und unter TLCA + TUDCA mit (♦, ■) und ohne (◇, □) Inhibition der p38^{MAPK}, für TLCA + TUDCA dargestellt in hoher Inhibitorkonzentration (500 nmol/l) (MW ± SD, n = 3-6)

Gruppe	c 3	c 4	c 5	c 6	d 3	d 4
Gallensäure	TLCA + TUDCA			TUDCA		
Inhibitor	SB 202 474	SB 202 190	SB 202 474 500 nmol/l	SB 202 190 500 nmol/l	SB 202 474	SB 202 190
GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min						
Σ (51.-100. min)	493,2 ± 141,9	505,4 ± 71,8	472,6 ± 93,4	540,8 ± 103,4	797,5 ± 75,6	784,54 ± 89,89

Tabelle 35: GS-DNP-Sekretion unter TUDCA alleine und unter TLCA + TUDCA mit (SB 202 190) und ohne (SB 202 474) Inhibition der p38^{MAPK} (MW ± SD, n = 3-6)

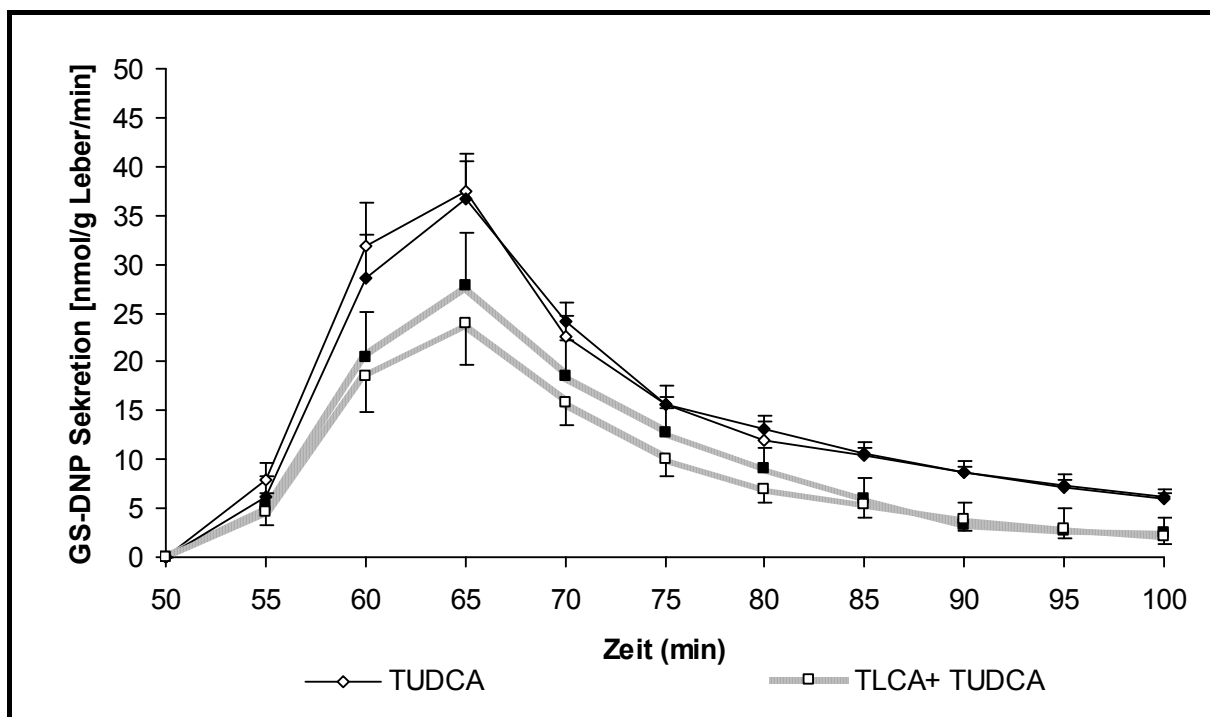


Abbildung 41: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TUDCA alleine und unter TLCA + TUDCA mit (♦, ■) und ohne (◇, □) Inhibition der p38^{MAPK}, für TLCA + TUDCA dargestellt in hoher Inhibitorkonzentration (500 nmol/l) (MW ± SD, n = 3-6)

3.2.3.2 Effekt des MAPKK-Inhibitors PD 98 059

Inhibition der Erk1/2-Aktivierung durch Applikation von PD 98 059 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TUDCA hatte keinen Effekt auf Gallenfluß oder GS-DNP-Sekretion, die anticholestatische Wirkung der TUDCA wurde nicht antagonisiert. Jedoch senkte PD 98 059 unter alleiniger Infusion von TUDCA den Gallenfluß signifikant auf 72% ($45,7 \pm 14,9$ vs. $63,8 \pm 8,8$ $\mu\text{l/g/min}$; $p < 0,05$; s. **Tabelle 36** und **Abbildung 42**), die GS-DNP-Sekretion tendenziell auf 69% von Kontrollen ohne Inhibitor ($658,7 \pm 168,6$ vs. $456,6 \pm 177,5$ $\mu\text{l/g/min}$; s. **Tabelle 37** und **Abbildung 43**), die choleretische Wirkung der TUDCA wurde also partiell antagonisiert.

Gruppe	c 1	c 2	d 1	d 2
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA	TUDCA	TUDCA
Inhibitor	DMSO	PD 98 059	DMSO	PD 98 059
Gallenfluß in $\mu\text{l/g}$ Leber/min				
Σ (51.-100. min)	$31,5 \pm 18,5$	$29,9 \pm 13,3$	$63,8 \pm 8,8$	$45,7 \pm 14,9$ §

Tabelle 36: Gallenfluß unter TUDCA und TLCA + TUDCA mit und ohne Inhibition der MAPK Erk1/2-Aktivierung (MW ± SD, n = 5, § p = 0,05 vs. TUDCA)

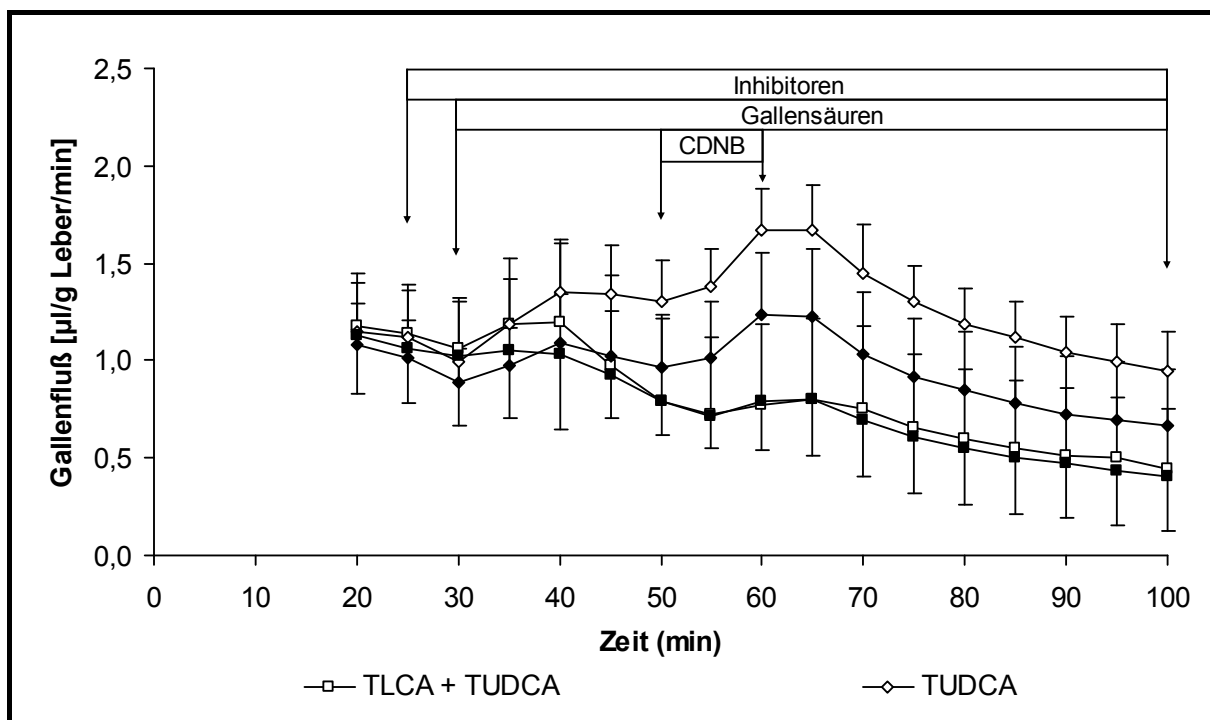


Abbildung 42: Vergleich des Gallenflusses unter TUDCA und unter TLCA + TUDCA mit (◆, ■) und ohne (◇, □) Inhibition der MAPK Erk1/2 (MW ± SD, n = 5)

Gruppe	c 1	c 2	d 1	d 2
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA	TUDCA	TUDCA
Inhibitor	DMSO	PD 98 059	DMSO	PD 98 059
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min			
Σ (51.-100. min)	167,7 ± 93,6	168,0 ± 62,6	658,7 ± 168,6	456,6 ± 177,5

Tabelle 37: GS-DNP-Sekretion unter TUDCA und TLCA + TUDCA mit und ohne Inhibition der MAPK Erk1/2 (MW ± SD, n = 5)

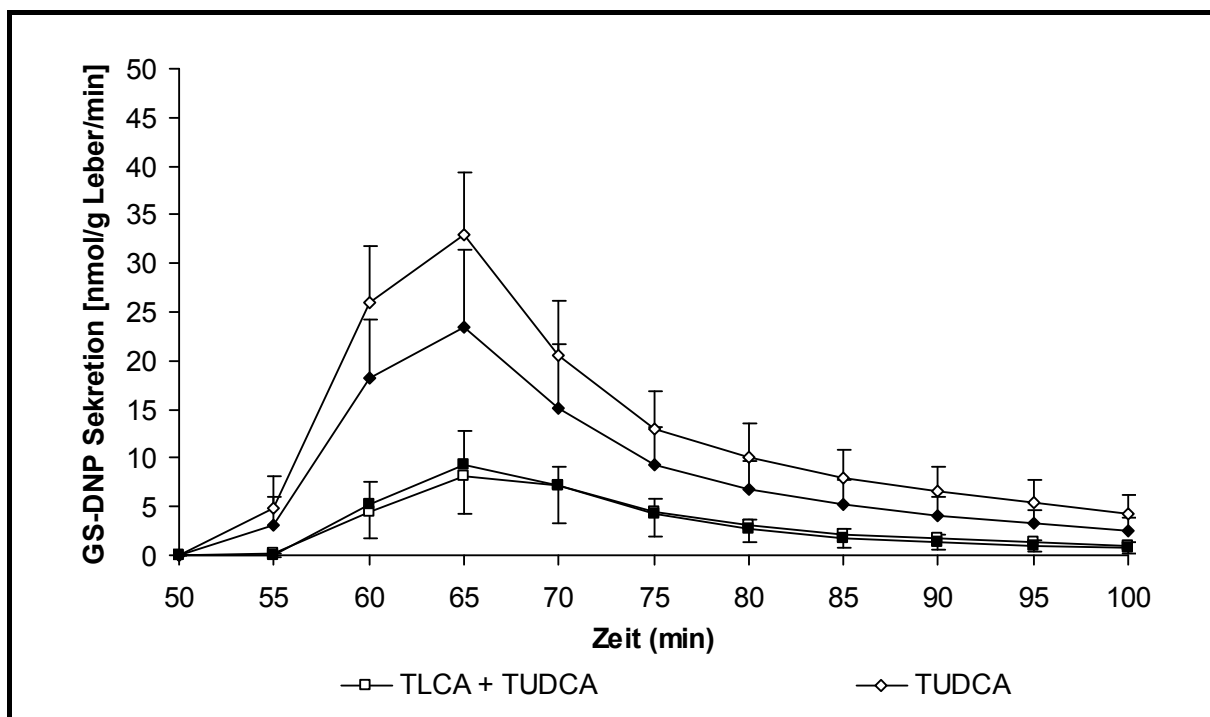


Abbildung 43: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TUDCA und unter TLCA + TUDCA mit (◆, ■) und ohne (◇, □) Inhibition der MAPK Erk1/2 (MW ± SD, n = 5)

3.2.3.3 Effekt der Koadministration von PD 98 059 und SB 202 190

Auch gleichzeitige Inhibition der Erk1/2-Aktivierung und der p38^{MAPK} durch gleichzeitige Applikation von PD 98 059 und von SB 202 190 zusätzlich zu den Gallensäuren TLCA + TUDCA hatte keinerlei Effekt auf Gallenfluß (s. **Tabelle 38** und **Abbildung 44**) oder GS-DNP-Sekretion (s. **Tabelle 39** und **Abbildung 45**); die anticholestatische Wirkung der TUDCA blieb unbeeinflusst.

Gruppe	c 3	c 7
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	SB 202 474	SB 202 190 + PD 98 059
	Gallenfluß in µl/g Leber/min	
Σ (51.-100. min)	84,6 ± 9,0	86,4 ± 9,8

Tabelle 38: Gallenfluß unter TLCA + TUDCA mit und ohne gleichzeitige Inhibition der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 (MW ± SD, n = 4-5)

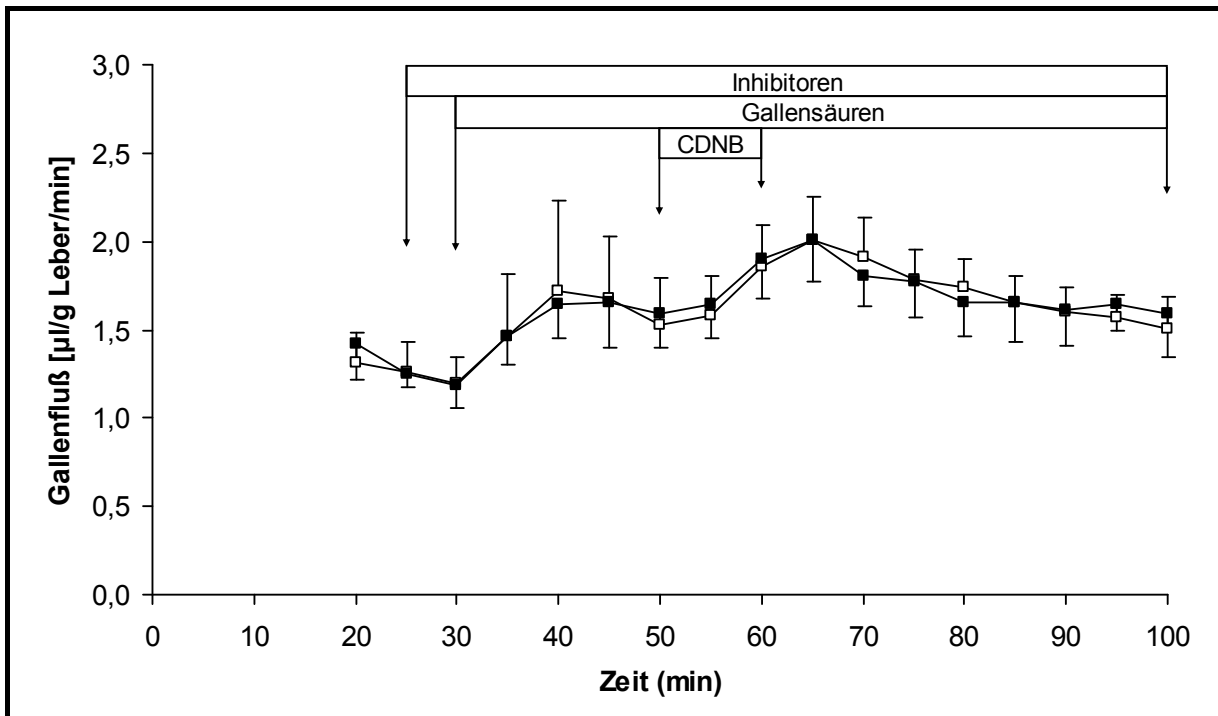


Abbildung 44: Vergleich des Gallenflusses unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) gleichzeitige Inhibition der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 (MW ± SD, n = 4-5)

Gruppe	c 3	c 7
Gallensäure	TLCA + TUDCA	TLCA + TUDCA
Inhibitor	SB 202 474	SB 202 190 + PD 98 059
	GS-DNP-Sekretion in nmol/g Leber/min	
Σ (51.-100. min)	493,2 ± 141,9	684,3 ± 160,2

Tabelle 39: GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit und ohne gleichzeitige Inhibition der MAP-Kinasen Erk1/2 + p38 (MW ± SD, n = 4-5)

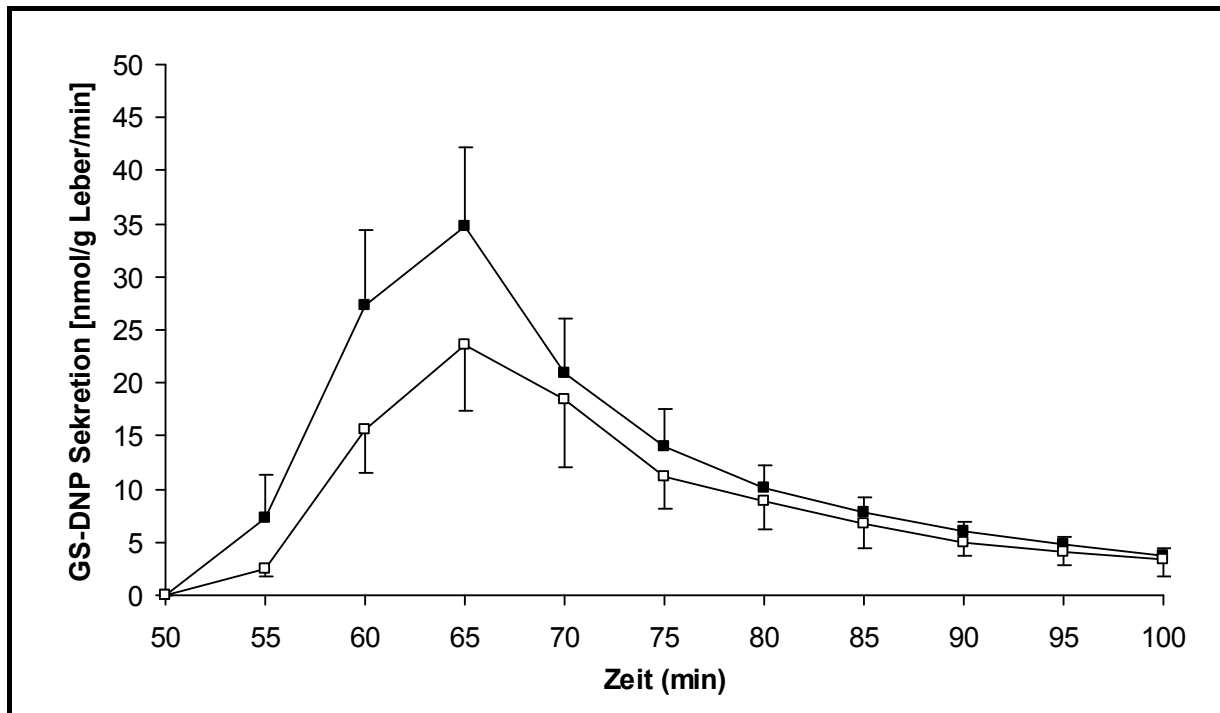


Abbildung 45: Vergleich der GS-DNP-Sekretion unter TLCA + TUDCA mit (■) und ohne (□) gleichzeitige Inhibition der MAP-Kinasen Erk1/2 + p38 (MW ± SD, n = 4-5)

3.2.4 Einfluss von Gallensäuren und MAPK-Inhibitoren auf die hepatovenöse LDH-Freisetzung

Die hepatovenöse Freisetzung von LDH aus der Leber in das Effluat diente in unseren Versuchen als Maß für die Schwere der Leberzellschädigung (s. **Kap. 2.1.3**). Infusion von TLCA führte sowohl alleine als auch unter Koadministration von TUDCA zu einer deutlich gesteigerten LDH-Freisetzung. Inhibition des Erk1/2-Signalweges oder der p38^{MAPK} alleine beeinflussten die LDH-Freisetzung nicht signifikant. Gleichzeitige Infusion von PD 98 059 und SB 202190 in Versuchen mit TLCA + TUDCA hingegen resultierte in einer deutlichen Reduktion des Leberzellschadens im Vergleich mit Versuchen unter TLCA + TUDCA ohne Enzyminhibition ($52,8 \pm 17,1$ vs. $16,8 \pm 7,2$; $p < 0,01$) (s. **Tabelle 40**).

Gruppe	Gallensäure	Inhibitor	LDH-Freisetzung (mU/min/g)
a 1	DMSO	DMSO	2,34 ± 1,53
a 2	DMSO	PD 98 059	3,82 ± 2,66
a 3	DMSO	SB 202 474	2,31 ± 1,91
a 4	DMSO	SB 202 190	29,92 ± 27,63
b 1	TLCA	DMSO	74,19 ± 67,21
b 2	TLCA	PD 98 059	15,81 ± 5,63
b 3	TLCA	SB 202 474	61,94 ± 16,35
b 4	TLCA	SB 202 190	50,67 ± 17,94
c 1	TLCA + TUDCA	DMSO	79,73 ± 43,47
c 2	TLCA + TUDCA	PD 98 059	60,41 ± 50,47
c 3	TLCA + TUDCA	SB 202 474	52,83 ± 17,09
c 4	TLCA + TUDCA	SB 202 190	84,12 ± 69,22
c 5	TLCA + TUDCA	SB 202 474 500 nmol/l	37,99 ± 18,35
c 6	TLCA + TUDCA	SB 202 190 500 nmol/l	46,79 ± 37,52
c 7	TLCA + TUDCA	SB 202 190 + PD 98 059	16,83 ± 7,24 *
d 1	TUDCA	DMSO	2,72 ± 1,96
d 2	TUDCA	PD 98 059	8,31 ± 13,12
d 3	TUDCA	SB 202 474	5,65 ± 5,95
d 4	TUDCA	SB 202 190	3,42 ± 3,52

Tabelle 40: Einfluss von Gallensäuren und Enzyminhibitoren auf die hepatozelluläre LDH-Freisetzung bei Ende des Versuchs im Vergleich zur Kontrolle mit dem Lösungsvermittler DMSO (MW ± SD, n = 3-6, * p<0.01 vs. TUDCA + TLCA + SB202474)

3.3 Aktivierung von PI3-Kinase-Isoformen durch Gallensäuren

Primäre Rattenhepatozyten wurden mit hydrophoben und hydrophilen Gallensäuren stimuliert. Der Grad der Phosphorylierung der PKB wurde 5, 15, 30 und 60 min nach Stimulation bestimmt, um Aufschluss über die globale PI3-Kinasen Aktivität zu diesen Zeitpunkten zu erhalten. Zum so ermittelten Zeitpunkt maximaler Phosphorylierung der PKB wurden in einem isoformspezifischen Kinaseassay die Aktivitäten der Isoformen der katalytischen Einheit der Klasse I PI3-Kinasen p110 α , p110 β und p110 γ bestimmt, um die Annahme gallensäurenspezifischer Aktivierungsmuster für die unterschiedlichen Isoformen zu überprüfen.

3.3.1 PKB-Phosphorylierung als Maß der PI3-Kinase-Gesamtaktivität

Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden für 5, 15, 30 und 60 min mit den hydrophoben Gallensäuren TLCA (25 μ M) und GCDCA (50 μ M) und den hydrophileren Gallensäuren TCA (50 μ M) und TUDCA (50 μ M) sowie DMSO (0,1%) als Kontrolle stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde der Grad der Phosphorylierung der PKB als Maß für die Aktivität der PI3-Kinasen bestimmt. Alle Gallensäuren führten dabei nach 15 und 30 min zu einem signifikanten ($p < 0,05$), aber transienten Anstieg der PKB Aktivität im Vergleich zu Versuchen mit dem Gallensäureträger DMSO, wobei die Aktivierung durch TLCA am stärksten war (s. **Tabelle 41**).

Zeit	5 min	15 min	30 min	60 min
Versuchsbedingung	PKB-Phosphorylierung relativ zu DMSO			
TLCA 25 μ M	1,37 \pm 0,29	4,85 \pm 1,26 *	4,11 \pm 1,39 *	2,16 \pm 1,04
GCDCA 50 μ M	1,01 \pm 0,11	1,78 \pm 0,26 *	2,63 \pm 0,77 *	1,63 \pm 0,89
TCA 50 μ M	0,88 \pm 0,09	1,79 \pm 0,32 *	1,98 \pm 0,41 *	1,52 \pm 0,75
TUDCA 50 μ M	1,06 \pm 0,24	2,84 \pm 0,16 *	2,99 \pm 0,61 *	2,10 \pm 0,90

Tabelle 41: Phosphorylierungsgrad der PKB nach Stimulation durch Gallensäuren relativ zu Versuchen mit DMSO (MW \pm SD, n = 4, * $p < 0,05$ vs. DMSO, ANOVA)

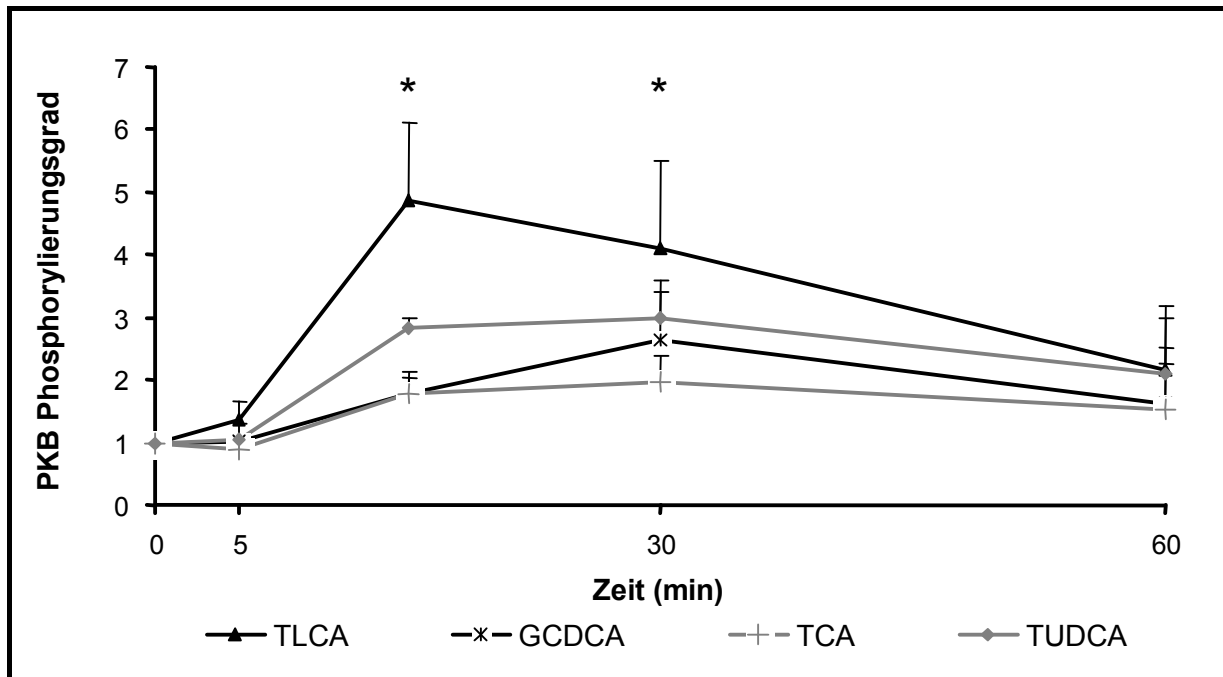


Abbildung 46: Phosphorylierungsgrad der PKB nach Stimulation durch Gallensäuren relativ zu Versuchen mit DMSO (MW ± SD, n = 4, * p<0,05 vs. DMSO, ANOVA)

3.3.2 Aktivierung der PI3-Kinase-Isoformen p110 α , β und γ durch Gallensäuren

Auf dem Boden der Ergebnisse zur PKB-Phosphorylierung aus 3.3.1 wurden primäre Rattenhepatozyten für 15 min mit den Gallensäuren TLCA (25 μ M), GCDCA (50 μ M), TCA (50 μ M) und TUDCA (50 μ M) sowie mit DMSO (0,1%) als Kontrolle stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die Aktivität der PI3-Kinase-Isoformen p110 α , β und γ in einem isoformspezifischen radioaktiven Kinaseassay bestimmt. **Abbildung 42** zeigt exemplarisch den Autoradiographiefilm eines p110 β Assays.

Es zeigte sich für jede der Gallensäuren ein spezifisches Aktivierungsmuster verschiedener PI3-Kinase-Isoformen. So wurde die PI3-Kinase-Isoform p110 α von GCDCA und TUDCA signifikant aktiviert, die Aktivität von p110 β war unter allen Bedingungen signifikant erhöht und die p110 γ -Aktivität stieg signifikant unter Behandlung mit TLCA und GCDCA an (s. **Tabelle 42** und **Abbildungen 48 - 50**). **Abbildung 47** fasst die Aktivierungsmuster der vier getesteten Gallensäuren zusammen.

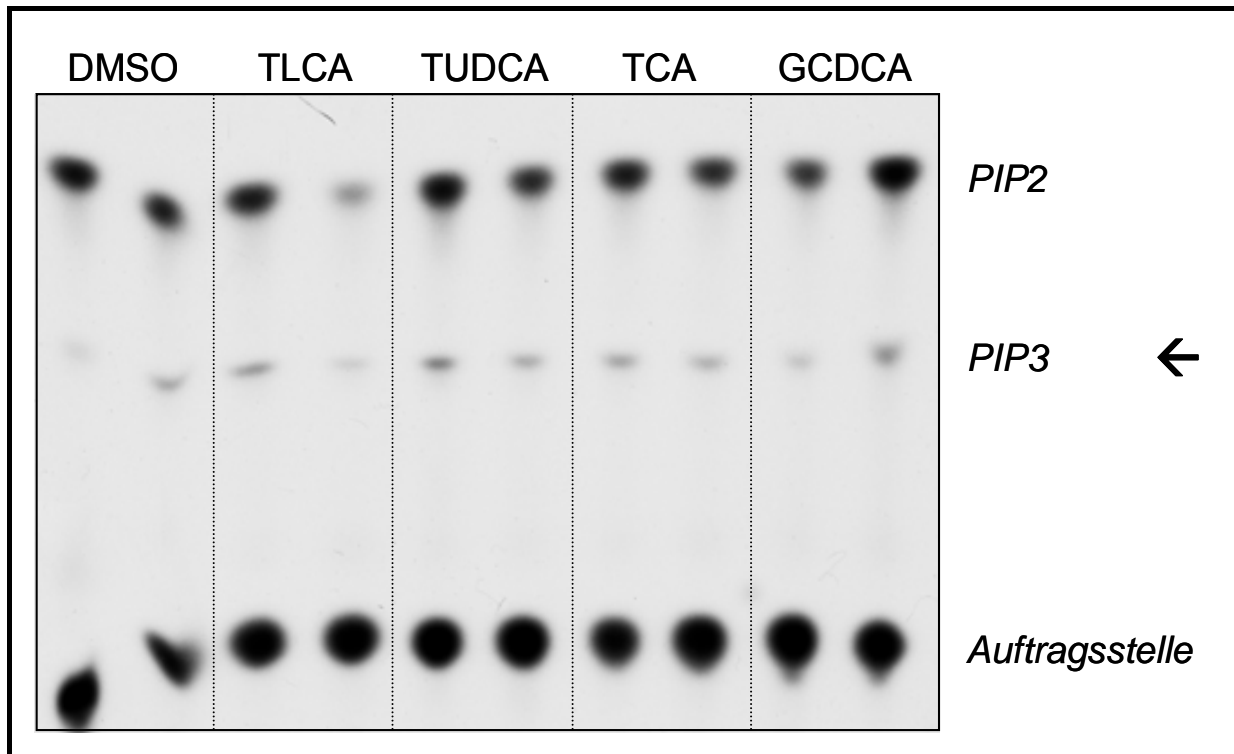


Abbildung 47: Autoradiographiefilm nach isoformspezifischen PI3-Kinase Assay gegen p110 β (jede Probe wurde zweimal bestimmt) nach 5 Stunden Zerfallszeit, PIP3 (Pfeil) ist das PI3-Kinasen-spezifische Produkt

Versuchsbedingung	p110 α	p110 β	p110 γ
TLCA 25 μ M	1,07 \pm 0,66	1,50 \pm 0,16 *	1,99 \pm 0,28 *
GCDCA 50 μ M	1,61 \pm 0,69 *	1,60 \pm 0,66 *	1,30 \pm 0,26 *
TCA 50 μ M	1,18 \pm 0,76	1,46 \pm 0,18 *	1,05 \pm 0,69
TUDCA 50 μ M	1,51 \pm 0,73 *	1,63 \pm 0,23 *	1,21 \pm 0,86

Tabelle 42: Aktivierung der PI3-Kinase Isoformen α , β und γ relativ zu DMSO (MW \pm SD, n = 6, 5 bzw. 4 für α , β bzw. γ , *p<0,05 vs. DMSO, ANOVA)

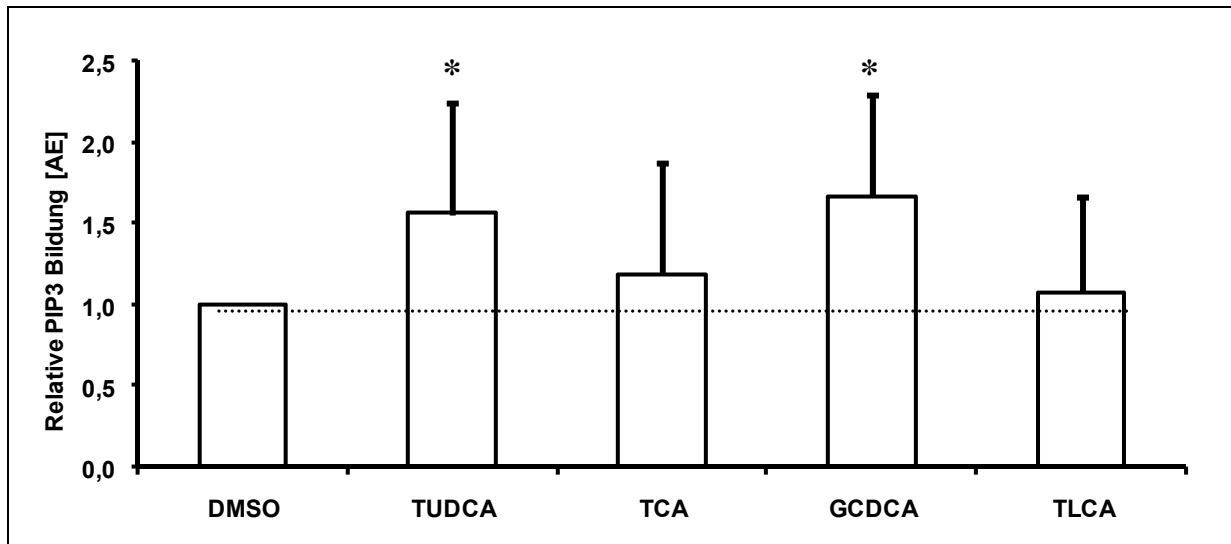


Abbildung 48: Produktion des Kinaseprodukts PIP3 nach Präzipitation von p110 α
(MW \pm SD, n = 6, * p<0,05 vs. DMSO, ANOVA)

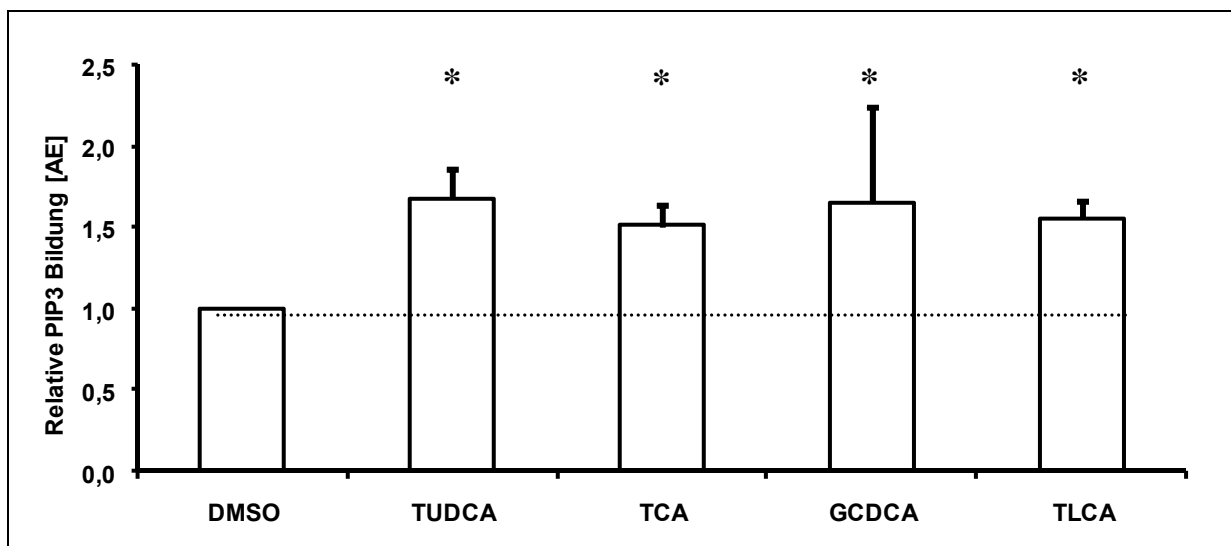


Abbildung 49: Produktion des Kinaseprodukts PIP3 nach Präzipitation von p110 β
(MW \pm SD, n = 5, * p<0,05 vs. DMSO, ANOVA)

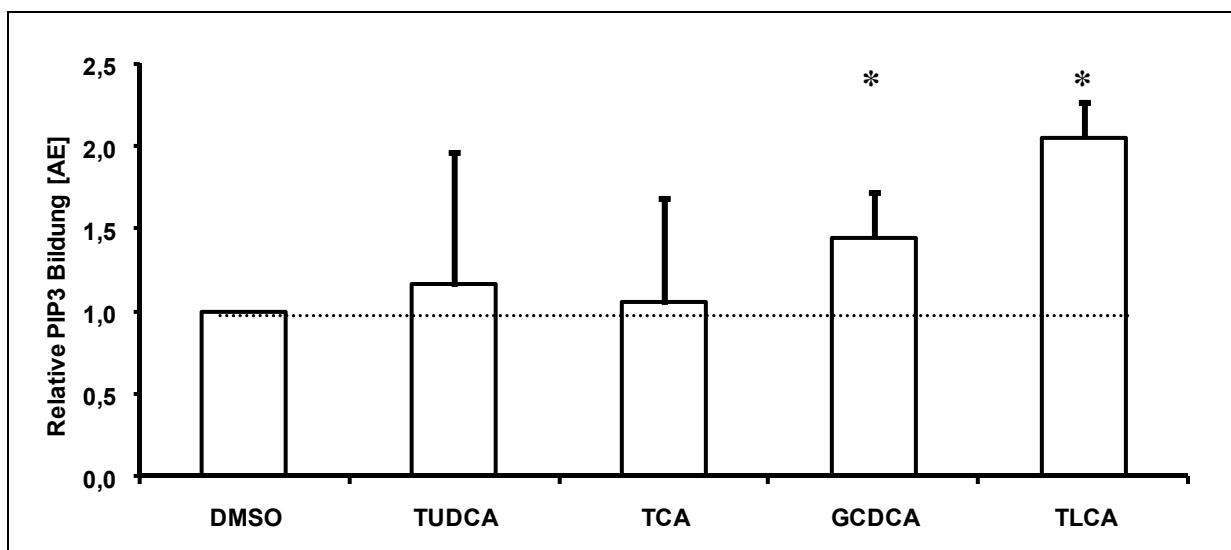


Abbildung 50: Produktion des Kinaseprodukts PIP3 nach Präzipitation von p110 γ
(MW \pm SD, n = 4, * p<0,05 vs. DMSO, ANOVA)

	p110 α	p110 β	p110 γ
TLCA 25 μ M		+	+
GCDCA 50 μ M	+	+	+
TCA 50 μ M		+	
TUDCA 50 μ M	+	+	

Tabelle 43: PI3-Kinasen-Aktivierungsschema verschiedener Gallensäuren (n = 4-6; +: p<0,05 vs. DMSO, ANOVA)

3.3.3 Bedeutung der PI3-Kinase-Isoform p110 γ für Gallensäure-induzierte Apoptose

Wie in den Untersuchungen zur Aktivierung verschiedener PI3-Kinase-Isoformen in Rattenhepatozyten durch Gallensäuren unter 3.3.2 gezeigt wurde, aktivieren unter den untersuchten Gallensäuren nur die beiden hydrophoben, Apoptose-induzierenden Gallensäuren TLCA und GCDCA die PI3-Kinase-Isoform p110 γ . Im Folgenden wurde daher die Bedeutung der PI3-Kinase p110 γ als Mediator Gallensäuren-abhängiger Apoptose untersucht.

3.3.3.1 Effekt eines PI3-Kinase p110 γ Inhibitors auf Gallensäure-induzierte Apoptose

Stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfizierte HepG2-Zellen wurden für 4 Stunden mit den hydrophoben, Apoptose-induzierenden Gallensäuren TLCA (20 μ M), GLCA (20 μ M), TCDCA (75 μ M) und GCDCA (75 μ M) stimuliert und die Isoform der PI3-Kinase p110 γ durch den spezifischen Inhibitor AS-604850 gehemmt. Die Apoptose wurde im Anschluss sowohl in einem Caspase 3/7-Assay als auch morphologisch nach Kernfärbung bestimmt (s. **Kap. 2.5.4**).

Im Caspase 3/7 Assay induzierten die Gallensäuren TLCA, GLCA, TCDCA und GCDCA eine 71,2-, 14,5-, 31,5- und 41,6-fach gesteigerte Apoptose im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Inhibition der PI3-Kinasen-Isoform p110 γ reduzierte diesen

apoptotischen Effekt auf 27,2-, 2,0-, 12,6-, und 12,6-fach gesteigerte Apoptoseraten. Die apoptotische Wirkung von Etoposid bzw. TNF α /Actinomycin D mit 2,0- bzw. 13,0- fach gesteigerten Apoptoseraten Apoptose im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen blieb von der Inhibition der PI3-Kinasen-Isoform p110 γ unbeeinflusst (s. **Tabelle 44, Abbildung 51**).

Auch in der morphologischen Evaluation der Apoptoserate zeigte sich nach Stimulation mit den genannten Gallensäuren eine deutliche 128,6-, 36,4-, 58,4- und 70,0-fache Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen im Vergleich zu DMSO. Inhibition der PI3-Kinasen-Isoform p110 γ reduzierte diesen apoptotischen Effekt wiederum auf 67,6-, 10,3-, 26,9-, und 28,1-fach gesteigerte Apoptoseraten (s. **Tabelle 45, Abbildung 52**).

Caspase 3/7 - Aktivität		
Versuchsbedingung	Kontrolle	PI3K p110 γ Inhibitor
DMSO 1‰	1,1 \pm 0,5	0,9 \pm 0,5
TLCA 20 μ M	71,2 \pm 16,5	27,2 \pm 23,6 *
GLCA 20 μ M	14,5 \pm 11,2	2,0 \pm 0,5
TCDCA 75 μ M	31,5 \pm 7,4	12,6 \pm 10,2 *
GCDCA 75 μ M	41,6 \pm 18,9	12,6 \pm 12,5 *
Etoposid	2,03 \pm 0,80	1,88 \pm 0,35
TNF α /Actinomycin D	12,99 \pm 5,50	12,92 \pm 5,83

Tabelle 44: Relative Caspase 3/7 Aktivität nach Stimulation mit und ohne Inhibition (Kontrolle) der PI3-Kinase p110 γ , normalisiert auf Werte nicht-stimulierter Zellen (MW \pm SD, n = 4, * p<0,05 vs. Kontrolle, t-test)

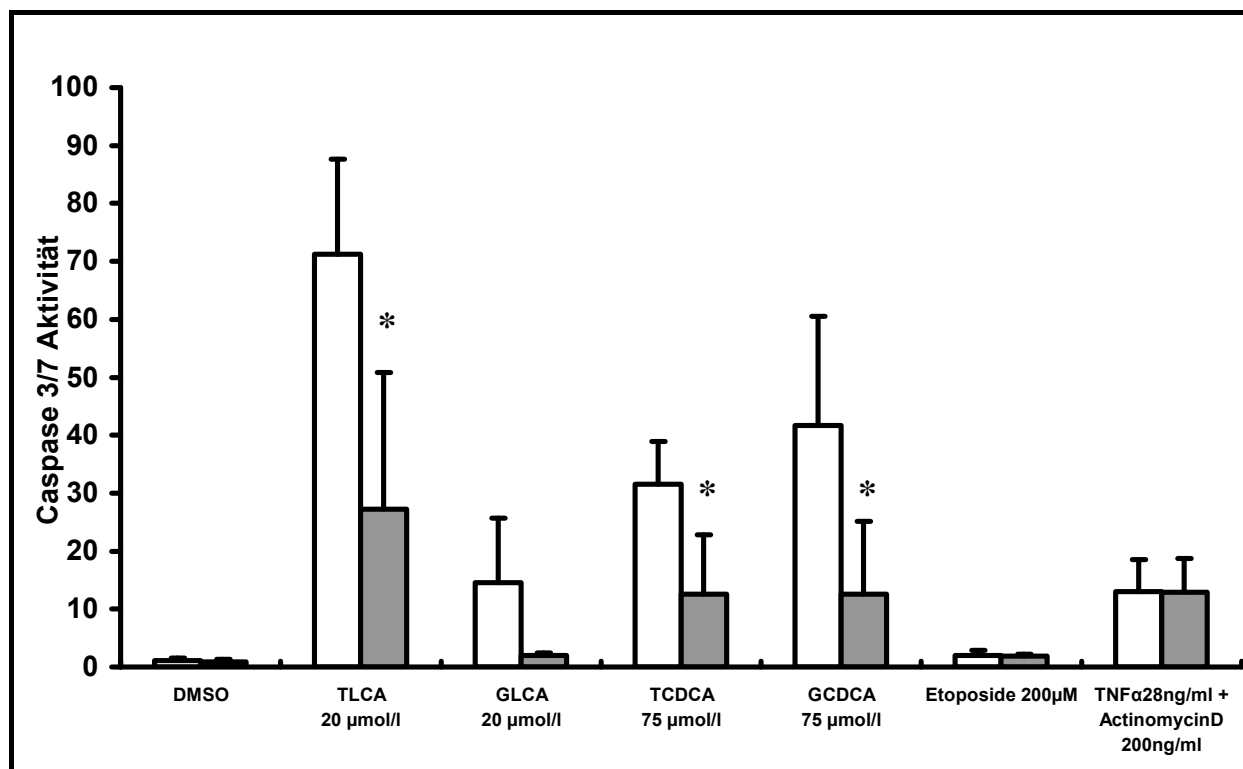


Abbildung 51: Relative Caspase 3/7 Aktivität nach Stimulation mit (■) und ohne (□) Inhibition (Kontrolle) der PI3-Kinase p110 γ , normalisiert auf Werte nicht-stimulierter Zellen (MW \pm SD, n = 4, * p<0,05 vs. Kontrolle, t-test)

Morphologisch ermittelte Apoptoserate (%)		
Versuchsbedingung	Kontrolle	PI3K p110 γ Inhibitor
DMSO 1‰	0,6 \pm 0,6	0,4 \pm 0,2
TLCA 20 μ M	79,5 \pm 6,9	28,3 \pm 20,0 *
GLCA 20 μ M	22,5 \pm 9,1	4,3 \pm 0,9 *
TCDCA 75 μ M	36,1 \pm 11,5	11,3 \pm 5,3 *
GCDCA 75 μ M	43,2 \pm 11,5	11,8 \pm 5,3 *

Tabelle 45: Morphologisch ermittelte Apoptoserate (in %) nach Stimulation von HepG2-Zellen mit Gallensäuren mit und ohne Inhibition (Kontrolle) der PI3-Kinase p110 γ (MW \pm SD, n = 4, * p<0,05 vs. Kontrolle, t-test)

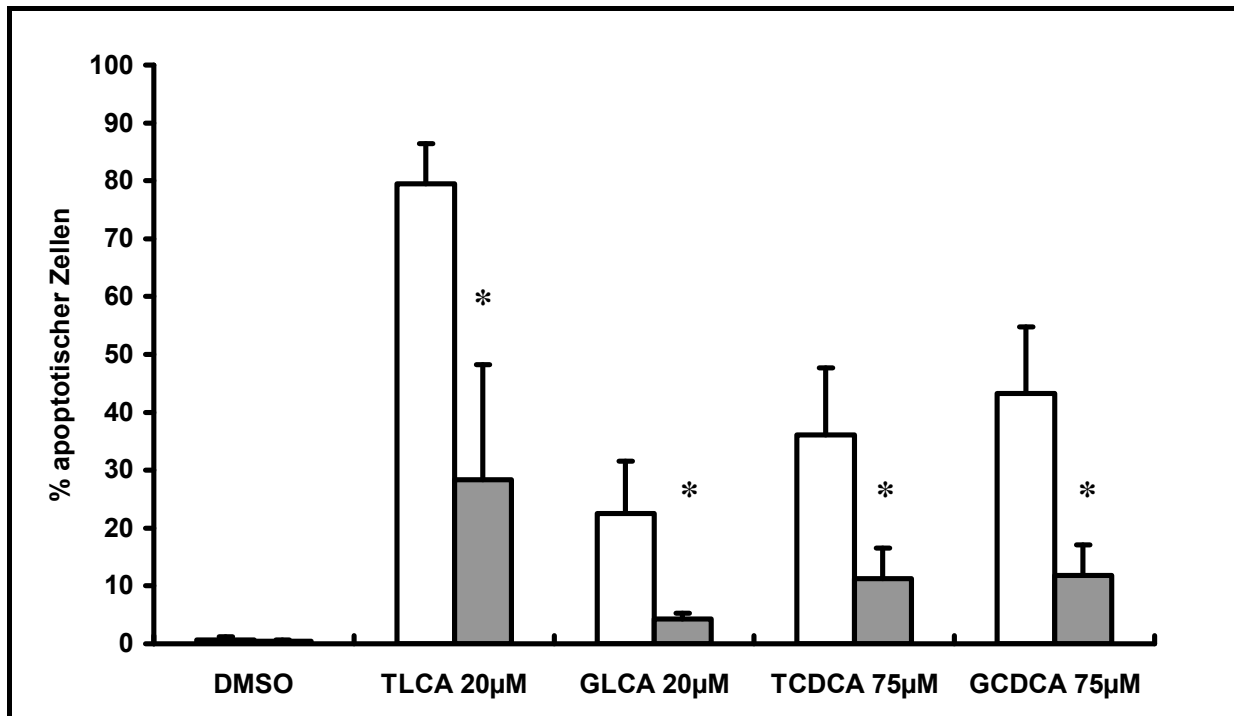


Abbildung 52: Morphologisch ermittelte Apoptoserate nach Stimulation von HepG2-Zellen mit Gallensäuren, mit (■) und ohne (□) Inhibition (Kontrolle) der PI3-Kinase p110 γ (MW \pm SD, n=4, * p<0,05, t-test)

3.3.3.2 Effekt der Transfektion von HepG2-Zellen mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ auf Gallensäure-induzierte Apoptose

Stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfizierte HepG2-Zellen wurden für 72 Stunden mit siRNA gegen die PI3-Kinasen-Isoform p110 γ bzw. mit unspezifischer Kontroll-siRNA scheintransfiziert und im Anschluss für 4 Stunden mit den hydrophoben, Apoptose-induzierenden Gallensäuren TLCA (20 μ M), GLCA (20 μ M), TCDCA (75 μ M) und GCDCA (75 μ M) stimuliert. Die Apoptose wurde sodann in einem Caspase 3/7-Assay quantifiziert (s. **Kap. 2.5.4**).

In scheintransfizierten Zellen induzierten die Gallensäuren TLCA, GLCA, TCDCA und GCDCA wie erwartet eine deutlich gesteigerte Apoptoserate und erhöhten die Caspase 3/7-Aktivität auf 40,4-, 17,7-, 34,8- und 38,5-fache Werte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Vorangegangene Transfektion mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ verminderte die apoptotische Wirkung der Gallensäuren, sodass lediglich eine 25,4-, 5,6-, 10,6- bzw. 14,4-fache Steigerung der Caspase 3/7 Aktivität resultierte (s. **Tabelle 46, Abbildung 53**).

Caspase 3/7 - Aktivität		
Versuchsbedingung	Kontroll-siRNA	PI3K p110 γ siRNA
DMSO 1‰	2,9 \pm 0,3	1,8 \pm 0,1
TLCA 20 μ M	40,4 \pm 24,9	25,2 \pm 8,8
GLCA 20 μ M	17,7 \pm 4,8	5,6 \pm 1,3
TCDCA 75 μ M	34,8 \pm 20,7	10,6 \pm 2,2
GCDCA 75 μ M	38,5 \pm 23,0	14,4 \pm 4,9

Tabelle 46: Relative Caspase 3/7 Aktivität nach Stimulation mit Gallensäuren nach Transfektion mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ oder Scheintransfektion, normalisiert auf Werte nicht-stimulierter Zellen (MW \pm SD, n = 3)

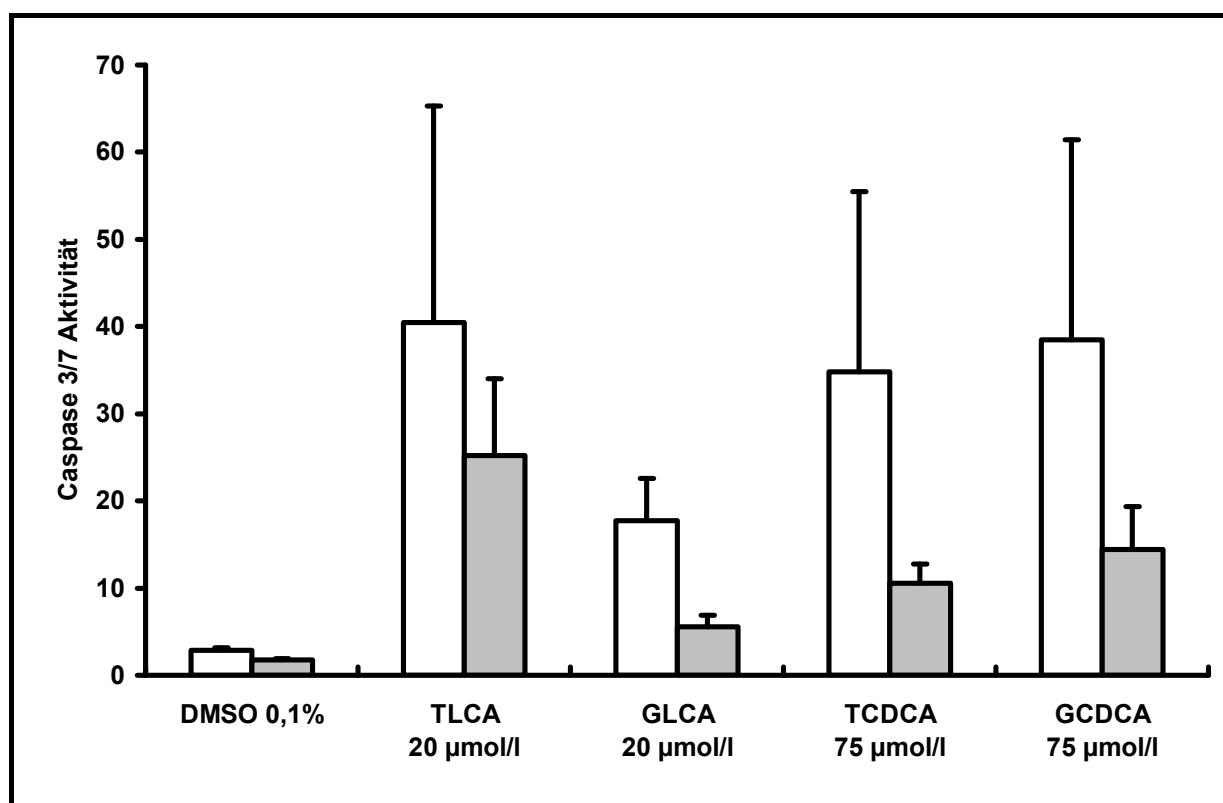


Abbildung 53: Relative Caspase 3/7 Aktivität nach Stimulation mit Gallensäuren nach Transfektion mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ (■) oder Scheintransfektion (□), normalisiert auf Werte nicht-stimulierter Zellen (MW \pm SD, n = 3)

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Bedeutung der Proteinkinasen PKA, PKB, cPKCa und nPKC ϵ , der MAPK Erk1/2 und p38 und der PI3-Kinase-Isoformen p110 α , p110 β und p110 γ für die (anti-)cholestatischen und (anti-)apoptotischen Wirkungen physiologischer Gallensäuren in Leberzellen. Hauptziel der Arbeit war dabei die weitere Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die für die klinisch-therapeutisch bedeutenden anticholestatischen Effekte des Taurinkonjugats der Ursodeoxycholsäure (TUDCA) und die pathophysiologisch relevanten cholestatischen und proapoptotischen Effekte von Tauroolithocholsäure (TLCA) und Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) verantwortlich zeichnen.

In der jüngeren Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Gallensäuren potente Signalmoleküle darstellen und schon in geringen mikromolaren Konzentrationen, wie sie beim Menschen unter (patho)physiologischen Bedingungen im Serum beobachtet werden, wichtige Leberzellfunktionen beeinflussen.^{65, 75, 151}

Hydrophobe Gallensäuren wie Chenodeoxycholsäure (CDCA), Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) können so Cholestase und Apoptose auslösen. Das Glycinkonjugat von CDCA (GCDCA) ist unter cholestatischen Bedingungen die bedeutendste hydrophobe, toxische Gallensäure des Menschen und wird als hauptverantwortlich für Gallensäuren-induzierten Leberzellschaden bei Cholestase angesehen. Daneben ist LCA die am stärksten cholestatisch wirkende der quantitativ relevanten Gallensäuren des Menschen. Ihr Taurinkonjugat TLCA wurde in verschiedenen Versuchsmodellen für die Induktion einer Cholestase evaluiert.

Hydrophilere Gallensäuren dagegen wirken in ihrer Mehrzahl hepatoprotektiv und anticholestatisch. Ihr bedeutsamster Vertreter ist UDCA, die bei einer Reihe von cholestatischen Lebererkrankungen des Menschen erfolgreich therapeutisch eingesetzt wird. In den vergangenen Jahren wurden Fortschritte in der Entschlüsselung der molekularen Wirkmechanismen dieser Gallensäure erzielt. Dennoch gelang bisher die Charakterisierung der durch UDCA modifizierten molekularen Signalwege nur partiell. Die erhobenen Befunde wurden zudem kontrovers diskutiert.

Um die Relevanz der durch Gallensäuren modulierten Signaltransduktionswege für die Vermittlung ihrer (anti-)cholestatischen und (anti-)apoptotische Wirkungen besser verstehen zu können, untersuchte die vorliegende Arbeit:

(i) Die Bedeutung der Signalmediatoren PKA, PKB, cPKC α und nPKC ϵ und der MAPK Erk1/2 und p38 für den anticholestatischen Effekt der TUDCA *in vitro* und in einem *in vivo* Modell der Cholestase (s. **Kap. 4.1**)

(ii) Die Bedeutung verschiedener Isoformen der PI3-Kinase für die Vermittlung der Signale von hydrophoben, cholestatischen und proapoptotischen, sowie hydrophilen, anticholestatisch und antiapoptotisch wirkenden Gallensäuren (s. **Kap. 4.2**).

Die hier diskutierten Ergebnisse zeigen, dass der posttranskriptionell vermittelte anticholestatische Effekt der TUDCA im Modell TLCA-induzierter Cholestase durch einen kooperativen cPKC α - und PKA-abhängigen Signalweg vermittelt wird. Die über die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen Erk1/2 und p38^{MAPK} wirkenden Signalwege scheinen hingegen ohne Bedeutung für die anticholestatische Wirkung der TUDCA. Weiter konnten wir zeigen, dass unterschiedliche Gallensäuren verschiedene Isoformen der PI3-Kinasen aktivieren, wodurch sie ihre zum Teil konträren Wirkungen auf Leberfunktionen vermitteln könnten. Die apoptotische Wirkung der hydrophoben Gallensäuren TLCA und GCDCA wird dabei über die p110 γ -Isoform vermittelt.

4.1 Signalmediatoren der anticholestatischen Wirkung der TUDCA

UDCA wird in der Therapie verschiedenster Funktionsstörungen der Leber erfolgreich eingesetzt. Ihre größte Bedeutung hat sie in der Behandlung von chronischen cholestatischen Leberkrankheiten wie der PBC und der PSC, für die sie die einzige etablierte pharmakologische Therapieoption darstellt^{89, 152}. So verlängert UDCA bei Patienten mit PBC signifikant das transplantationsfreie Überleben^{87, 153}, senkt den prognostisch bedeutsamen Serumspiegel von Bilirubin, hemmt die Fibrosebildung in der Leber, senkt die Komplikationsraten der fortgeschrittenen

Krankheit und beeinflusst positiv die Lebensqualität der Patienten^{80, 81, 154} (s. **Kap. 1.1.2**).

UDCA wird nach Aufnahme in die Leber schnell und effektiv mit Glyzin und Taurin konjugiert. Daher wird für Untersuchungen zur Wirkweise der UDCA in Tiermodellen meist das bei Nagetieren (anders als beim Menschen) vorherrschende Taurinkonjugat der UDCA (TUDCA) verwendet.

Verschiedene Effekte der (T)UDCA werden im Menschen bzw. Tiermodell für die genannten protektiven Eigenschaften verantwortlich gemacht. So wirkt (T)UDCA in der Leber antiapoptotisch, hat immunomodulatorische Effekte und schützt das Gallengangsepithel vor der Zytotoxizität hydrophober Gallensäuren. Durch Steigerung der hepatozellulären Sekretionskapazität verhindert (T)UDCA darüber hinaus die Akkumulation hepatotoxischer Substanzen, z.B. hydrophober Gallensäuren in der Leber. Diese Steigerung der hepatozellulären Sekretionskapazität wird sowohl im experimentellen Modell als auch beim Menschen durch eine gesteigerte Expression von Transportproteinen wie BSEP oder MDR3 erreicht⁹⁷, sowie möglicherweise durch Aktivierung dieser Transportproteine in ihrer Zielmembran (s. **Kap. 1.1.2.1**).

Entscheidend für die Wiederherstellung der Transportkapazität und damit der Entgiftungsfunktion der Leber durch TUDCA erscheinen jedoch posttranskriptionelle Prozesse, die zum Einbau von Transportproteinen in die kanalikuläre Membran von Hepatozyten führen. So wurde von Beuers *et al.* gezeigt, dass TUDCA in der cholestatischen Rattenleber die hepatobiliäre Exozytose und die Insertion der Konjugatexportpumpe Mrp2 sowie der Gallensalzexportpumpe Bsep in die kanalikuläre Membran stimuliert und damit die biliäre Sekretion organischer Anionen und den Gallenfluß wieder herstellt^{53, 54}. In primär nicht-cholestatischen, „normalen“ Hepatozyten wurden ähnliche Effekte beobachtet, die hier zur Stimulation der Sekretion von Gallensalzen und des Gallenflusses über das Ausgangsniveau hinaus, zur Choleresese führen^{32, 50, 98, 116}.

Die Signalwege, über die TUDCA die Insertion von Transportproteinen in ihre Zielmembranen moduliert, sind jedoch gegenwärtig noch nicht vollständig aufgeklärt und werden kontrovers diskutiert.

TUDCA führt in Hepatozyten durch Inositol-1,4,5-Trisphosphat-unabhängigen Ca^{++} Einstrom aus mikrosomalen Speichern^{57, 117} und über Ni^{++} -sensitive Kalziumkanäle der Plasmamembran^{46, 57, 117} zu einem anhaltenden Anstieg des freien zytosolischen Kalziums. In frühen Versuchen erwies sich die TUDCA-induzierte Exozytose in Rattenlebern zudem als Ca^{++} -abhängig⁴⁶. Des Weiteren transloziert TUDCA selektiv die α -Isoform der Ca^{++} -sensitiven cPKC, ein Schlüsselenzym der Ca^{++} -stimulierten Exozytose¹¹⁸, an die Hepatozytenmembran, wie unter anderem in unserer Arbeitsgruppe von Glasova *et. al.* gezeigt^{53, 59, 121, 155}. Darüber hinaus stimuliert TUDCA die Bildung des PKC-stimulierenden s,n-1,2-Diacylglycerin (DAG)⁵⁹ und aktiviert membrangebundene PKC^{59, 121}. Die so vermittelte PKC-Aktivität stimuliert die vesikuläre Exozytose^{46, 59, 156}, die als ein zentraler Prozess beim Einbau von Transportproteinen in die Plasmamembran angenommen wird¹¹⁷. In der Zusammenschau machten diese Erkenntnisse die Ca^{++} -abhängigen cPKC-Isoformen unter den denkbaren intrazellulären Signalmediatoren der TUDCA zu viel versprechenden Kandidaten. So konnte in der Vergangenheit durch Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen die physiologische Bedeutung eines Ca^{++} - und PKC-abhängigen Signalwegs in TUDCA-vermittelten Signalen *in vivo* und *in vitro* bestätigt werden. In primären Rattenhepatozyten verhinderte TUDCA Ca^{++} - und PKC-abhängig eine durch TLCA vermittelte Beeinträchtigung der Transportkapazität für Gallensäureanaloga¹²² und blockierte PKC-abhängig vollständig die Induktion einer Cholestase durch TLCA in Rattenlebern⁵³.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung PKC-abhängiger Signalwege für die anticholestatische Wirkung der TUDCA bestätigt. So hemmte der unselektive PKC-Inhibitor Staurosporin den anticholestatischen Effekt der TUDCA in TLCA-induzierter Cholestase. Er senkte den Gallenfluß tendenziell und die Mrp2-vermittelte GS-DNP-Sekretion signifikant im Vergleich zu Versuchen ohne Inhibitor (s. **Kap. 3.1.2.3**). Staurosporin hemmt jedoch auch Ca^{++} -unabhängige Isoformen der PKC, so z.B. nPKC ϵ , und andere Proteinkinasen, so z.B. PKA, wie in dieser Arbeit durch *in vitro* Untersuchungen bestätigt wurde (s. **Kap. 3.3.1**). Daher wurden die

Perfusionsversuche mit dem für cPKCs selektiven Inhibitor Gö6976 wiederholt. Überraschender Weise jedoch hatte die selektive Inhibition der cPKCs keinen signifikanten Einfluss auf die anticholestatische Wirkung der TUDCA. Der Gallenfluß blieb unter Gö6976 unverändert, wenngleich die GS-DNP-Sekretion tendenziell gesenkt wurde (s. **Kap. 3.1.2.3**). Das in der Hemmung des anticholestatischen Effekts der TUDCA wirksame Staurosporin unterscheidet sich vom vermeintlich unwirksamen Inhibitor Gö6976 in seiner Wirkung hauptsächlich durch das um die PKA erweiterte Wirkspektrum. Daher wurden in derselben Versuchsanordnung die Auswirkungen des selektiven PKA-Inhibitors H89 untersucht. Auch dieser hatte jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Wirkung der TUDCA und ließ Gallenfluß wie GS-DNP-Sekretion unbeeinträchtigt (s. **Kap. 3.1.2.3**).

Da weder selektive Inhibition der cPKC-Isoformen durch Gö6976, noch selektive Inhibition der PKA durch H89, wohl aber deren gleichzeitige Hemmung durch Staurosporin effektiv die anticholestatische Wirkung der TUDCA hemmen konnte, testeten wir im folgenden die Hypothese eines kooperativen cPKC/PKA-abhängigen Signalweges. Dazu kombinierten wir die Inhibitoren Staurosporin und H89. Obwohl Staurosporin bereits cPKC und PKA inhibiert, erschien diese Kombination sinnvoll, da Staurosporin in den vorliegenden *in vitro* Untersuchungen zwar die cPKC α Aktivität sehr effektiv auf 8% des Ausgangsniveaus hemmen konnte, die der PKA jedoch nur inkomplett auf 22%. Gleichzeitige Applikation von Staurosporin und H89 dagegen hemmte auch die PKA-Aktivität hochsignifikant auf 2% von Kontrollen (s. **Kap. 3.3.1**). Tatsächlich führte die kombinierte Anwendung von Staurosporin und H89 in den Perfusionsversuchen mit gleichzeitiger Infusion von TLCA und TUDCA zu einer deutlichen Verminderung des anticholestatischen Effekts der TUDCA, Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion wurden hochsignifikant reduziert (s. **Kap. 3.1.2.3**). Da Staurosporin allerdings, wie beschrieben, unselektiv verschiedene Ca⁺⁺-abhängige und Ca⁺⁺-unabhängige PKC-Isoformen hemmt, wiederholten wir diese Versuche unter kombinierter Anwendung von Gö6976 und H89. Die so erreichte selektive Inhibition der Ca⁺⁺-abhängigen cPKC-Isoformen und der PKA führte ebenfalls zu einer deutlichen Verminderung des anticholestatischen Effekts der TUDCA. Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion waren auch unter diesen Bedingungen signifikant geringer als in Versuchen ohne Inhibitoren (s. **Kap. 3.1.2.3**).

Keiner der hier beschriebenen Inhibitoren hatte dabei Einfluss auf die hepatischen Funktionsparameter unter nicht-cholestatischen Bedingungen oder auf den cholestatischen Effekt der TLCA (s. **Kap. 3.1.2.1** und **Kap. 3.1.2.2**).

Mit diesen Ergebnissen unterstreicht die vorliegende Arbeit die Bedeutung der PKC im Signalweg der TUDCA. Darüber hinaus bestätigen wir durch die Verwendung des cPKC-spezifischen Inhibitors Gö6976, dass Ca^{++} -abhängige cPKC-Isoformen den anticholestatischen Effekt der TUDCA entscheidend vermitteln. Unter den bisher bekannten cPKC-Isoformen cPKC α , cPKC β -I, cPKC β -II und cPKC γ konnten nur cPKC α und cPKC β -II in Hepatozyten nachgewiesen werden. Ein Nachweis, dass TUDCA auch cPKC β -II an hepatozytäre Membranen transloziert und aktiviert scheiterte bisher (unveröffentlichte Daten und ⁵⁹), wohingegen die Aktivierung der cPKC α , wie oben beschrieben, in verschiedenen Modellen mehrfach bestätigt wurde. Somit identifiziert diese Arbeit die α -Isoform der cPKC als einen bedeutenden Vermittler der anticholestatischen Wirkung der TUDCA in experimenteller Cholestase.

Die vorliegende Arbeit weist daneben erstmals auf eine entscheidende Rolle der PKA für die hepatoprotektiven Eigenschaften der TUDCA hin. Weder frühere Arbeiten ¹⁵⁷ noch die hier vorliegenden Untersuchungen konnten jedoch einen nennenswerten Effekt der TUDCA auf die hepatozelluläre PKA Aktivität nachweisen (s. **Kap. 3.1.2.6**). Aus diesem fehlenden Nachweis einer Aktivierung von PKA durch TUDCA wurde bisher geschlossen, dass PKA nicht zu den anticholestatischen Effekten der TUDCA beiträgt, wenngleich PKA in anderen Signalwegen ein gut beschriebener Mediator apikaler Sekretion in Hepatozyten ist ¹⁵⁸. Des Weiteren scheint die Bedeutung der PKA durch die Beobachtung in Frage gestellt, dass deren alleinige Hemmung in unserem Modell keinen Einfluss auf den anticholestatischen Effekt der TUDCA hatte. Wir postulieren daher, dass TUDCA zwar selbst keinen Einfluss auf die Aktivität der PKA in Hepatozyten hat, eine basale PKA Aktivität aber umgekehrt Voraussetzung für TUDCA-induzierte Effekte in der cholestatischen Leber ist. Es ist jedoch einzuräumen, dass die in dieser Arbeit gewählten Ansätze zur Erfassung der PKA-Aktivierung über die Bestimmung der CREB-Phosphorylierung und der cAMP-Konzentration im Lebergewebe möglicherweise unzureichend sind, um Aussagen über die Aktivität des komplexen PKA/cAMP-Signalweges in

Zellsubkompartimenten zu treffen. Weitere Untersuchungen sind daher *in vitro* nötig, um die Bedeutung der PKA vor allem im subapikalen Kompartiment für die Membraninsertion von Transportproteinen der Hepatozyten genauer zu charakterisieren.

Ein kooperativer cPKC α /PKA-abhängiger Signalweg, wie hier für die anticholestatische Wirkung der TUDCA postuliert, wurde schon in anderen Zelltypen für eine Stimulation der Sekretionskapazität verantwortlich gemacht^{126, 127}. Apikale und basolaterale Transporter und ihre Ankerproteine stellen dabei mögliche Ziele von cPKC α und PKA dar. Die Aminosäuresequenzen verschiedener Transportproteine wie Mrp2, Bsep oder Ntcp weisen zahlreiche mögliche Phosphorylierungsstellen für PKC und PKA auf. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass aus HepG2 Hepatomzellen immunopräzipitiertes MRP2 *in vitro* von rekombinanter cPKC α , nPKC ϵ und PKA phosphoryliert wird, und dass diese Phosphorylierung in Anwesenheit von Staurosporin gehemmt wird (s. **Kap. 3.1.3**). Diese Ergebnisse sind komplementär zu der früheren Beobachtung, dass auch Bsep von cPKC α phosphoryliert wird⁹⁹. Phosphorylierung von Transportproteinen kann dabei der Regulation von deren Transportkapazität dienen, wie für Bsep belegt⁹⁹, oder notwendiger Schritt zur Translokation an die Hepatozytenmembran bzw. zum Ausbau aus der Hepatozytenmembran sein, wie für den basolateralen Gallensäuretransporter Ntcp kürzlich gezeigt wurde¹⁴². Die Identifizierung weiterer für die Translokation und Aktivierung von Transportproteinen wie MRP2, BSEP oder NTCP entscheidender Phosphorylierungsstellen wird Voraussetzung für die weitere Entschlüsselung der für die anticholestatische Wirkung der TUDCA verantwortlichen posttranslationalen Prozesse sein.

Die Beobachtung einer für die Erhöhung der hepatozellulären Transportkapazität durch TUDCA notwendigen Stimulation des Einbaus von Transportproteinen in die kanalikuläre Membran konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Untersuchungen im Modell der Ntcp-transfizierten Hepatomzelllinie HepG2 bestätigt werden. Durch die Biotinylierungstechnik nachweisbar, antagonisierte TUDCA hier den durch TLCA induzierten Ausbau von MRP2 aus der Plasmamembran. Auch unter nicht-cholestatischen Bedingungen stieg unter Behandlung mit TUDCA tendenziell die Zahl der in der Plasmamembran befindlichen Transportproteine an (s. **Kap. 3.1.4**).

Damit konnte dieser im Rattenmodell gut belegte Wirkmechanismus der TUDCA erstmals in einem humanen Zellmodell nachvollzogen werden.

In einer Reihe von Arbeiten wurde in jüngster Zeit die Bedeutung der cPKC α für TUDCA-induzierte Signale in Frage gestellt und stattdessen eine cholestatische Wirkung der PKC-Aktivierung postuliert. So vermittelte der cPKC Agonist Thymeleatoxin in primär nicht-cholestatichen Lebern selbst eine Cholestase¹²³. Der weniger selektive Aktivator der PKC, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) führte in HepG2-Zellen zum Ausbau von MRP2 aus der kanalikulären Membran und zur Retention des MRP2-Substrats Glutathion-Methylfluorescein¹²⁴. Die aus diesen Daten gezogenen Rückschlüsse könnten jedoch zu kurz greifen, da PMA bzw. Thymeleatoxin selektiv nur PKC aktivieren, wohingegen TUDCA sehr komplex Einfluss auf verschiedenste Signaltransduktionswege nimmt, die miteinander vernetzt sind. Ihre Bedeutung für die Steuerung verschiedener Leberfunktionen durch TUDCA muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die oben genannten Daten bleiben daher nur eingeschränkt aussagekräftig.

Jedoch wurde nicht nur die Bedeutung der cPKC α für die Transduktion des anticholestatischen Effektes von TUDCA in Frage gestellt. Darüber hinaus wurde ein alternativer, MAPK-abhängiger Signalweg für die TUDCA-induzierte Leberzellsekretion postuliert. Die zu Grunde liegenden Untersuchungen wurden allesamt in nicht-cholestatichen Modellen durchgeführt. So scheint der choloretische Effekt von TUDCA in isoliert perfundierten Rattenlebern Integrin-abhängig über p38- und Erk1/2-MAPK vermittelt zu werden^{48, 98, 125}. In nicht-cholestatichen HepG2-Zellen erwies sich außerdem die TUDCA-induzierte Translokation von BSEP an die kanalikuläre Membran als p38^{MAPK}-abhängig¹¹⁶. Auf dem Boden dieser Erkenntnisse untersuchten wir daher die Bedeutung dieser MAPK für den protektiven Effekt der TUDCA in TLCA-induzierter Cholestase. Dabei behinderte weder pharmakologische Inhibition der Erk1/2 oder der p38^{MAPK} alleine, noch die gleichzeitige Hemmung von Erk1/2 und p38^{MAPK} die anticholestatische Wirkung von TUDCA (s. **Kap. 3.2.3**). Damit stehen diese Ergebnisse in Einklang mit einer Reihe früherer Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen, die darauf hinwiesen, dass TUDCA-vermittelte Effekte wie Stimulation des Gallenflusses oder der Sekretion organischer Anionen unter „normalen“, nicht-cholestatichen Bedingungen unabhängig von Ca⁺⁺ und Ca⁺⁺-

abhängiger $cPKC\alpha$ ⁴⁶ vermittelt werden und sich die hier wirksamen Signalwege damit grundlegend von den Verhältnissen unter Cholestase unterscheiden.

Die Bedeutung der Erk1/2 MAPK für die choleretische Wirkung der TUDCA konnte aber bestätigt werden. Der Inhibitor der Erk1/2-Aktivierung PD 98 059 antagonisierte signifikant die TUDCA-vermittelte Stimulation des Gallenflusses unter nicht-cholestatischen Bedingungen und konnte auch die GS-DNP-Sekretion tendenziell senken (s. **Kap. 3.2.3.2**). Dagegen gelang es nicht, die postulierte Bedeutung der $p38^{MAPK}$ für den choleretischen Effekt der TUDCA in unserem experimentellen Modell zu reproduzieren (s. **Kap. 3.2.3.1**), womit unsere Ergebnisse im Widerspruch zu den oben zitierten Untersuchungen stehen. Jedoch wurden diese in einem Modell zur Erfassung des gallensäurenabhängigen Gallenflusses unter ständiger Infusion von $100\mu\text{mol/l}$ TCA unter allen Versuchsbedingungen durchgeführt, womit auch die hepatozelluläre Gallensäuresekretion erfasst wurde. In unseren Versuchen verzichteten wir auf diesen Ansatz und untersuchten vorwiegend den gallensäurenunabhängigen Gallenfluß, mit dem Hauptaugenmerk auf der Sekretionsleistung der Leber für organische Anionen. Da TCA selbst stark anticholestatisch wirkt (s. **Kap. 3.1.2.1**), ist dieser Ansatz außerdem ungeeignet für die hier angestellten Untersuchungen zur anticholestatischen Wirkung der TUDCA.

Somit bestätigen diese Daten die schon früher getroffene Annahme, dass die choleretischen und anticholestatischen Wirkungen der TUDCA von grundlegend verschiedenen Signalwegen vermittelt werden⁷⁵. Der in dieser Arbeit entschlüsselte kooperative $cPKC\alpha$ /PKA-abhängige Signalweg der TUDCA unter cholestatischen Bedingungen scheint dabei für diese Gallensäure spezifisch zu sein. Eine weitere untersuchte hydrophile Gallensäure, TCA, wirkte ebenfalls stark anticholestatisch (s. **Kap. 3.1.2.1**), jedoch erwies sich dieser Effekt als weitgehend von $cPKC$ und PKA unabhängig. Hier hatte die gleichzeitige Infusion der Inhibitoren Staurosporin und H89 keinen Effekt auf den Gallenfluß, wenngleich die GS-DNP-Sekretion zwar signifikant, aber nur geringfügig gehemmt wurde (s. **Kap. 3.1.2.4**).

In allen Versuchsgruppen wurde außerdem die hepatovenöse LDH-Freisetzung bestimmt. Dabei bestätigte sich, dass der cholestatische Effekt der TLCA mit einer signifikanten Zytotoxizität einhergeht. Dieser Effekt wurde von TUDCA antagonisiert. Infusion von TLCA führte so zu einem massiven Anstieg der hepatovenösen LDH-

Aktivität im Vergleich zu Kontrollen mit DMSO, ein deutliches Anzeichen für die zytotoxische Potenz der TLCA. Zusätzliche Infusion von TUDCA konnte diese Zellschädigung verhindern und reduzierte die LDH-Freisetzung erheblich. Unter gleichzeitiger PKC/PKA-Inhibition verlor TUDCA diese zytoprotektive Wirkung und die LDH-Freisetzung stieg massiv an. Inhibition von PKA oder PKC alleine dagegen, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die LDH-Freisetzung (s. **Kap. 3.1.2.5**). Die Protektion vor TLCA-induziertem Leberzellschaden durch TUDCA scheint somit, ähnlich wie ihr anticholestatischer Effekt, durch einen kombinierten cPKC α -/PKA-abhängigen Mechanismus vermittelt zu sein.

Zusammenfassend leisten die vorliegenden Daten einen wesentlichen Beitrag zur besseren Charakterisierung der *in vivo* und *in vitro* gut beschriebenen anticholestatischen Wirkung der TUDCA. Durch Anwendung selektiver Enzyminhibitoren im Modell TLCA-induzierter Cholestase wurde ein kooperativer cPKC α - und PKA-abhängiger Signalweg identifiziert, der die posttranslationalen anticholestatischen und zytoprotektiven Effekte der TUDCA maßgeblich vermittelt und der für diese hydrophile Gallensäure spezifisch ist. Zudem wurde die Phosphorylierung des Transportproteins MRP2 *in vitro* als ein mögliches Zielprotein der TUDCA-Effektoren cPKC α und PKA identifiziert. Die Enzyme aus der Gruppe der MAPK Erk1/2 und p38 dagegen haben auf die Vermittlung anticholestatischer Effekte keinen Einfluss, wengleich sie eine gewisse Rolle für die choleretische Wirkung der TUDCA zu spielen scheinen.

4.2 Bedeutung von PI3-Kinase-Isoformen für Gallensäuren-induzierte Modulation von Zellsekretion und Zelltod

Enzyme der Klasse der PI3-Kinasen sind ubiquitär in allen Geweben vorkommende Signalmediatoren, die elementare zelluläre Vorgänge wie Zellwachstum,-proliferation und -überleben regulieren. Dabei scheinen hauptsächlich die Isoformen der Klasse I PI3-Kinasen signalmodulatorisch wirksam zu sein (s. **Kap. 1.1.3**). In der Leber wurden PI3-Kinasen auch als zentrale Regulatoren Gallensäuren-induzierter Modulation von Leberzellsekretion und -schädigung identifiziert, wobei sie die sehr

unterschiedlichen und zum Teil konträren Effekte hydrophober und hydrophiler Gallensäuren zu vermitteln scheinen.

So ließ sich die Induktion einer Cholestase durch TLCA in perfundierten Rattenlebern in einer Arbeit von Beuers *et. al.* durch pharmakologische Blockade der PI3-Kinasen hemmen⁵⁰. Ebenso wurde die Apoptose-induzierende Wirkung der GCDCA in perfundierten Rattenlebern in einer Arbeit von Rust *et. al.* als PI3-Kinasen-abhängig identifiziert⁴⁰. In der gleichen Arbeit wurde allerdings auch ein PI3-Kinasen-abhängiger Überlebenssignalweg einer anderen Gallensäure, TCDCA, beschrieben. Ebenso vermitteln die hepatoprotektiv wirksamen Gallensäuren TUDCA und TCA einige ihrer Effekte über PI3-Kinasen, so ihre choloretische Wirkung in der isoliert perfundierten Rattenleber^{140, 141} (s. **Kap 1.1.3.2**). PI3-Kinasen scheinen damit zentrale Modulatoren der Signalwege verschiedener Gallensäuren zu sein. Zur Klärung der Frage, wie ein Enzym die so konträren Wirkungen der verschiedenen Gallensäuren vermitteln kann, prüften wir folgende Hypothesen im Modell primärer Rattenhepatozyten: (1) Die Aktivierung der PI3-Kinasen durch verschiedene Gallensäuren erfolgt mit unterschiedlicher zeitlicher Kinetik. (2) Verschiedene Gallensäuren aktivieren selektiv unterschiedliche Isoformen der Klasse I PI3-Kinasen.

These 1 konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Als Maß für die PI3-Kinasen Gesamtaktivität wurde die Phosphorylierung der PKB in Lysaten primärer Hepatozyten nach verschiedenen Stimulationszeiten bestimmt. Die getesteten Gallensäuren TLCA, GCDCA, TCA und TUDCA aktivierten dabei allesamt transient die PKB nach 15 sowie nach 30 Minuten, wobei die Aktivierung durch TLCA am deutlichsten ausfiel (s. **Kap. 3.3.1**). Eine unterschiedliche Aktivierungskinetik konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Arbeiten von Beuers *et al.*, die, ebenfalls in primären Rattenhepatozyten, für TLCA eine dauerhafte Aktivierung der PKB über 60 Minuten hinaus, für TUDCA eine nur transiente Aktivierung nach 30 Minuten und für TCA keinen Effekt auf die PKB Phosphorylierung feststellten⁵⁰. In diesen Untersuchungen wurden die Gallensäuren jedoch in deutlich niedrigeren Konzentrationen eingesetzt, die einem Fünftel der von uns verwendeten entsprachen. In diesen niedrigen Konzentrationen könnte die Aktivierung von PI3-Kinasen durch die verschiedenen Gallensäuren unterschiedlich effektiv sein, wohingegen die von uns verwendeten Konzentrationen aller untersuchten Gallensäuren zu einer Aktivierung von PI3-Kinasen führten.

Gallensäurenkonzentrationen von 25µmol/l bis 50µmol/l waren unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen erforderlich, um eine Modulation der Aktivität der PI3-Kinase-Isoformen nachweisen zu können.

Die zweite These von differentieller Aktivierung unterschiedlicher Klasse I PI3-Kinasen durch verschiedene Gallensäuren wurde durch unsere Versuche bestätigt. Nach 15minütiger Stimulation primärer Rattenhepatozyten mit TLCA, GCDCA, TCA bzw. TUDCA ermittelten wir in einem isoformspezifischen Assay die Aktivität der PI3-Kinasen p110 α , p110 β und p110 γ . Dabei konnten wir für jede der Gallensäuren ein spezifisches Aktivierungsmuster verschiedener PI3-Kinase-Isoformen nachweisen (s. **Tabelle 43, Kap. 3.3.2**). Während die Aktivität der Isoform p110 β durch alle untersuchten Gallensäuren signifikant stimuliert wurde, zeigte sich die Aktivität der Isoform p110 α nur unter Behandlung mit GCDCA und TUDCA und die der Isoform p110 γ nur unter Behandlung mit TLCA und GCDCA signifikant erhöht (s. **Kap. 3.3.2**). Die Aktivierung der Isoform p110 β kann daher nicht die unterschiedlichen Wirkungen verschiedener Gallensäuren erklären. Die untersuchten Gallensäuren unterschieden sich jedoch in ihrer Fähigkeit, die Isoformen p110 α und p110 γ zu aktivieren. Letztere könnten daher für die teils gegensätzlichen PI3-Kinasen-abhängigen Effekte unterschiedlicher Gallensäuren verantwortlich zeichnen.

Es fiel auf, dass mit TLCA und GCDCA unter den getesteten Gallensäuren nur hydrophobe, Apoptose-induzierende Gallensäuren die p110 γ -Isoform der PI3-Kinasen aktivierten. In weiteren Untersuchungen testeten wir daher die Hypothese der Abhängigkeit Gallensäuren-induzierter Apoptose von PI3-Kinase p110 γ . Dazu stimulierten wir Ntcp-transfizierte HepG2 Zellen für 4 Stunden mit den hydrophoben Gallensäuren TLCA, GLCA, TCDCA und GCDCA mit und ohne gleichzeitige pharmakologische Inhibition der PI3-Kinase p110 γ . Im Anschluss ermittelten wir in einem kommerziellen Aktivitätsassay die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 als Maß der Apoptose und beurteilten darüber hinaus nach Kernfärbung auch morphologisch die Zahl apoptotischer Zellen. In den Caspase 3/7-Assays untersuchten wir außerdem die Apoptose-auslösenden Agenzien Etoposid und TNF α /ActinomycinD, um die Bedeutung der PI3-Kinase p110 γ in Gallensäuren-unabhängiger Apoptose beurteilen zu können. Sowohl in den Caspase 3/7-Assays als auch unter morphologischer Beurteilung der Zellen zeigte sich die durch

Gallensäuren induzierte Apoptose unter PI3-Kinase p110 γ -Inhibition deutlich und zum Teil hochsignifikant vermindert. Etoposid- bzw. TNF α /ActinomycinD-induzierte Apoptose jedoch wurde durch den verwendeten Inhibitor nicht beeinflusst. In einem weiteren experimentellen Schritt transfizierten wir die HepG2-Ntcp Zellen über 72 Stunden mit siRNA gegen PI3-Kinase p110 γ bzw. mit Kontroll-siRNA, stimulierten die Zellen wiederum mit den Gallensäuren TLCA, GLCA, TCDCA bzw. GCDCA und ermittelten die Aktivität der Caspasen 3 und 7 als Maß der Apoptose. Auch in diesem Versuchsansatz war die apoptotische Wirkung der getesteten Gallensäuren unter Ausschaltung der PI3-Kinase p110 γ im Vergleich zu scheintransfizierten Zellen deutlich vermindert. Gallensäuren-abhängige, nicht aber Gallensäuren-unabhängige Apoptose scheint also zum Teil über die p110 γ -Isoform der PI3-Kinasen vermittelt zu werden. (s. **Kap. 3.3.3**)

In zukünftigen Untersuchungen sollte die Stellung der PI3-Kinase p110 γ in den bekannten Signalkaskaden Gallensäuren-induzierter Apoptose definiert werden. Auch die potentielle Bedeutung der PI3-Kinase p110 γ für die Induktion einer Cholestase durch hydrophobe Gallensäuren wird zu untersuchen sein. Ein seit kurzem erhältlicher Inhibitor der PI3-Kinase p110 α wird außerdem dazu beitragen, die funktionelle Bedeutung dieser Isoform für TUDCA-induzierte Signale zu ergründen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Gallensäuren stellen potente Signalmoleküle dar, die schon in geringen mikromolaren Konzentrationen, wie sie beim Menschen im Serum beobachtet werden, zentrale Leberzellfunktionen auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene beeinflussen. Die hydrophoben und potentiell toxischen Gallensäuren Lithocholsäure (LCA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) induzieren Apoptose und Cholestase, während hydrophile Gallensäuren hepatoprotektiv wirken können. Unter ihnen ist die antiapoptotisch und anticholestatisch wirksame Ursodeoxycholsäure (UDCA) von besonderer Bedeutung. UDCA stellt derzeit das einzige wirksame Therapeutikum bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten dar.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Bedeutung intrazellulärer Signaltransduktionswege für die choloretischen, (anti-)cholestatischen und (anti-)apoptotischen Wirkungen physiologischer Gallensäuren in verschiedenen experimentellen Modellen.

Hauptziel der Arbeit war die genauere Charakterisierung (i) der für den klinisch bedeutenden anticholestatischen Effekt des Taurinkonjugats der Ursodeoxycholsäure (TUDCA) verantwortlichen Signaltransduktionswege, und (ii) der zentralen Stellung von PI3-Kinasen in der intrazellulären Signalvermittlung der biologischen Effekte hydrophiler und hydrophober Gallensäuren.

Im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber untersuchten wir die anticholestatische und hepatoprotektive Wirkung der TUDCA in der intakten Leber unter Einsatz pharmakologischer Enzyminhibitoren. Als Leberfunktionsparameter dienten quantitativer Gallenfluß, Sekretion des Modellsubstrats der Konjugatexportpumpe Mrp2, GS-DNP, in die Galle und als Marker der Leberzellschädigung die hepatovenöse LDH-Freisetzung. Simultane Hemmung der cPKC α und der PKA, nicht aber Hemmung von cPKC α oder PKA allein antagonisierte bei Taurolithocholsäure (TLCA)-induzierter Cholestase die protektive Wirkung der TUDCA. Gallenfluß und GS-DNP-Sekretion waren unter gleichzeitiger Hemmung beider Signalwege signifikant reduziert, wohingegen die LDH-Freisetzung deutlich erhöht war. Die Ergebnisse zeigen, dass der posttranskriptionell vermittelte anticholestatische Effekt der TUDCA im etablierten Modell TLCA-induzierter Cholestase durch einen kooperativen cPKC α - und PKA-abhängigen Signalweg vermittelt wird. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen Erk1/2- und p38-abhängige Signalwege hingegen, die als Vermittler von TUDCA-induzierter Cholestase unter nicht-cholestatischen Bedingungen beschrieben wurden, waren im untersuchten Modell ohne Bedeutung für die anticholestatische Wirkung der TUDCA.

Mit Hilfe der neu etablierten Biotinylierung von Membranproteinen konnten wir in Ntcp-transfizierten humanen Hepatomzellen (HepG2-Ntcp) zeigen, dass TUDCA unter Cholestase die Insertion von MRP2 in die Hepatozytenmembran anregt. Dieser für die klinische Wirksamkeit der (T)UDCA potentiell bedeutende und im Tiermodell von uns vorherbeschriebene Wirkmechanismus konnte damit erstmals in einem humanen Modell nachvollzogen werden.

Ein weiterer *in vitro* Ansatz untersuchte die Phosphorylierung von aus HepG2-Ntcp immunopräzipitiertem MRP2 durch die als Gallensäureeffektoren diskutierten Proteinkinasen cPKC α , nPKC ϵ und PKA. Alle drei Proteinkinasen phosphorylierten, durch den PKC/PKA-Inhibitor Staurosporin hemmbar, MRP2. Diese Phosphorylierung könnte, wie für die Gallensäuretransporter BSEP und NTCP bereits gezeigt, Einfluss auf Aktivität und Membraninsertion von MRP2 haben.

Der funktionellen Bedeutung der PI3-Kinasen, welchen in den bisher entschlüsselten Signalwegen sowohl hydrophober/toxischer wie auch hydrophiler/protektiver Gallensäuren eine zentrale Rolle zugesprochen worden war („PI3-Kinasen-Paradoxon“), galten unsere *in vitro* Untersuchungen zur Aktivität der Isoformen der Klasse I PI3-Kinasen p110 α , p110 β und p110 γ nach Stimulation von primären Rattenhepatozyten mit TLCA, GCDCA, TCA und TUDCA in einem neu etablierten isoformspezifischen Kinaseassay. Dabei zeigte sich für jede Gallensäure ein für sie spezifisches Aktivierungsmuster unterschiedlicher PI3-Kinase-Isoformen. PI3-Kinase p110 γ wurde dabei spezifisch durch die cholestatisch und apoptotisch wirkenden Gallensäuren TLCA und GCDCA aktiviert. In HepG2-Ntcp-Zellen untersuchten wir daher die Bedeutung von p110 γ für Gallensäuren-induzierte Apoptose nach deren pharmakologischer Hemmung bzw. nach Transfektion mit siRNA gegen p110 γ . Die apoptotische Wirkung u.a. der Gallensäuren TLCA und GCDCA war unter beiden Methoden der p110 γ -Antagonisierung deutlich reduziert, wie sowohl in einem Caspase3/7-Assay als auch morphologisch evaluiert. Gallensäuren-unabhängige Apoptose, durch Etoposid bzw. TNF α ausgelöst, war p110 γ -unabhängig. Die Bedeutung der Aktivierung der PI3-Kinase-Isoform p110 α durch TUDCA ist durch weitere experimentelle Untersuchungen zu klären.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit tragen zum Verständnis der komplexen Signalgebung im Rahmen cholestatischer Leberschädigung und der therapeutischen Wirkung der (T)UDCA bei und sind damit für die Entwicklung neuer Therapiestrategien bei cholestatischen Leberkrankheiten potentiell von Bedeutung.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 1998;339:1217-27.
2. Bauchmüller K. Charakterisierung der durch hydrophobe Gallensäuren induzierten Leberzellschädigung und deren Modulation durch Phosphatidylinositol-3-Kinasen und Sulfasalazin. *Dissertationsarbeit, LMU München* 2005.
3. Rust C, Rau H, Gerbes AL, Pape GR, Haller M, Kramling H, Schildberg FW, Paumgartner G, Beuers U. Liver transplantation in primary biliary cirrhosis: risk assessment and 11-year follow-up. *Digestion* 2000;62:38-43.
4. Kim WR, Lindor KD, Locke GR, 3rd, Therneau TM, Homburger HA, Batts KP, Yawn BP, Petz JL, Melton LJ, 3rd, Dickson ER. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community. *Gastroenterology* 2000;119:1631-6.
5. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261-73.
6. Poupon R, Chazouilleres O, Poupon RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol* 2000;32(1):129-40.
7. Cullen SN, Chapman RW. Review article: current management of primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21:933-48.
8. Bambha K, Kim WR, Talwalkar J, Torgerson H, Benson JT, Therneau TM, Loftus EV, Jr., Yawn BP, Dickson ER, Melton LJ, 3rd. Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a United States community. *Gastroenterology.* 2003;125:1364-9.
9. Javitt NB. Cholestasis in rats induced by tauroolithocholate. *Nature* 1966;210:1262-3.
10. Leung PS, Coppel RL, Gershwin ME. Etiology of primary biliary cirrhosis: the search for the culprit. *Semin Liver Dis.* 2005;25:327-36.
11. van Milligen de Wit AW, van Deventer SJ, Tytgat GN. Immunogenetic aspects of primary sclerosing cholangitis: implications for therapeutic strategies. *Am J Gastroenterol* 1995;90:893-900.
12. Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatology.* 2008;47:737-45.
13. Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, Podda M, Leung PS, Kenny TP, Van De Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Gershwin ME. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology.* 2003;38:1250-7.
14. Rieger R, Leung PS, Jeddelloh MR, Kurth MJ, Nantz MH, Lam KS, Barsky D, Ansari AA, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Identification of 2-nonynoic

- acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006;27:7-16. Epub 2006 Jul 28.
15. Terjung B, Bogsch F, Klein R, Sohne J, Reichel C, Wasmuth JC, Beuers U, Sauerbruch T, Spengler U. Diagnostic accuracy of atypical p-ANCA in autoimmune hepatitis using ROC- and multivariate regression analysis. *Eur J Med Res.* 2004;9:439-48.
 16. Terjung B, Worman HJ. Anti-neutrophil antibodies in primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2001;15:629-42.
 17. Lo SK, Fleming KA, Chapman RW. Prevalence of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis using an alkaline phosphatase technique. *Gut.* 1992;33:1370-5.
 18. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology.* 1991;100:1590-6.
 19. Donaldson PT. Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis. *Gut.* 2004;53:599-608.
 20. Worthington J, Chapman R. Primary sclerosing cholangitis. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:41.
 21. Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 1991;14:920-6.
 22. Kitani K, Ohta M, Kanai S. Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat. *Am J Physiol* 1985;248:G407-17.
 23. Holsti P. Cirrhosis of the liver induced in rabbits by gastric instillation of 3-monohydroxycholanic acid. *Nature* 1960:250.
 24. Van Nieuwkerk CM, Elferink RP, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GN, Dingemans KP, Van Den Bergh Weerman MA, Offerhaus GJ. Effects of Ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterology* 1996;111:165-71.
 25. Carey JB, Jr., Wilson ID, Zaki FG, Hanson RF. The metabolism of bile acids with special reference to liver injury. *Medicine (Baltimore).* 1966;45:461-70.
 26. Greim H, Trulzsch D, Roboz J, Dressler K, Czygan P, Hutterer F, Schaffner F, Popper H. Mechanism of cholestasis. 5. Bile acids in normal rat livers and in those after bile duct ligation. *Gastroenterology.* 1972;63:837-45.
 27. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990;12:1216-21.

28. Greim H, Trulzsch D, Czygan P, Rudick J, Hutterer F, Schaffner F, Popper H. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 1972;63:846-50.
29. Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses*. 1986;19:57-69.
30. Patel T, Spivey J, Vadakekalam J, Gores GJ. Apoptosis – an alternative mechanism of bile salt hepatotoxicity. In: Paumgartner G, Beuers UH, eds. *Bile acids in liver diseases*. Dordrecht, Boston, London.: Kluwer Academic Publishers, 1995:88-95.
31. Reichen J, Simon FR. Cholestasis. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DAH, eds. *The liver. Biology and pathobiology*. . Volume 3. Auflage. New York: Raven Press, 1994:1291-1326.
32. Denk GU. Zur Bedeutung von Phosphatidylinositol-3-Kinasen für die Modulation hepatobiliärer Sekretion durch Gallensäuren in der perfundierten Rattenleber. *Dissertationsarbeit, LMU München* 2002.
33. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995;21:1725-41.
34. Benz C, Angermuller S, Tox U, Kloters-Plachky P, Riedel HD, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol* 1998;28:99-106.
35. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-9.
36. Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems. *Methods Enzymol* 1978;52:48-59.
37. Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3- kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2000;275:20210-6.
38. Bernt C, Vennegeerts T, Beuers U, Rust C. The human transcription factor AP-1 is a mediator of bile acid-induced liver cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340:800-6. Epub 2005 Dec 20.
39. Rust C, Bauchmuller K, Bernt C, Vennegeerts T, Fickert P, Fuchsbichler A, Beuers U. Sulfasalazine reduces bile acid induced apoptosis in human hepatoma cells and perfused rat livers. *Gut* 2006;55:719-27.
40. Rust C, Bauchmuller K, Fickert P, Fuchsbichler A, Beuers U. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling modulates taurochenodeoxycholic acid-induced liver injury and cholestasis in perfused rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289:G88-94. Epub 2005 Mar 3.

41. Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* 2004;39:1563-73.
42. Utanohara S, Tsuji M, Momma S, Morio Y, Oguchi K. The effect of ursodeoxycholic acid on glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicology*. 2005;214:77-86.
43. Brauer RW, Pessotti RL. The effect of choleric and of hydrocholeric agents on bile flow and bile solids in the isolated perfused liver. *Science*. 1952;115:142-3.
44. Javitt NB, Emerman S. Effect of sodium tauroolithocholate on bile flow and bile acid excretion. *J Clin Invest* 1968;47:1002-14.
45. Yousef IM, Bouchard G, Tuchweber B, Plaa GL. Monohydroxy bile acid induced cholestasis: role of biotransformation. *Drug Metab Rev.* 1997;29:167-81.
46. Beuers U, Nathanson MH, Isales CM, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca⁺⁺ mechanisms defective in cholestasis. *J Clin Invest* 1993;92:2984-93.
47. Misra S, Varticovski L, Arias IM. Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285:G316-24. Epub 2003 Apr 17.
48. Schliess F, Kurz AK, vom Dahl S, Haussinger D. Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 1997;113:1306-14.
49. Wahllander A, Sies H. Glutathione S-conjugate formation from 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and biliary S-conjugate excretion in the perfused rat liver. *Eur J Biochem* 1979;96:441-446.
50. Beuers U, Denk GU, Soroka CJ, Wimmer R, Rust C, Paumgartner G, Boyer JL. Tauroolithocholic acid exerts cholestatic effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets. *J Biol Chem* 2003;278:17810-8.
51. Hofmann AF. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 2004;36:703-22.
52. Hofmann AF. Bile acids. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DAH, eds. *The liver: biology and pathobiology*. . Volume 2. Auflage. New York: Raven Press, 1988:553 – 572.
53. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, Dombrowski F. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001;33:1206-16.

54. Dombrowski F, Stieger B, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Lab Invest* 2006;in press.
55. Kullak-Ublick GA, Baretton GB, Oswald M, Renner EL, Paumgartner G, Beuers U. Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2002;23:78-82.
56. Oswald M, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Beuers U. Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis. *Liver* 2001;21:247-53.
57. Beuers U, Nathanson MH, Boyer JL. Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic Ca²⁺ signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1993;104:604-12.
58. Combettes L, Berthon B, Doucet E, Erlinger S, Claret M. Bile acids mobilise internal Ca²⁺ independently of external Ca²⁺ in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1990;190:619-23.
59. Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS, Isales CM, Thasler W, Kullak-Ublick GA, Sauter G, Koebe HG, Paumgartner G, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1996;110:1553-63.
60. Beuers U, Probst I, Soroka C, Boyer JL, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G. Modulation of protein kinase C by taurochenodeoxycholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1999;29:477-82.
61. Cenni V, Doppler H, Sonnenburg ED, Maraldi N, Newton AC, Toker A. Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem J* 2002;363:537-45.
62. Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM, Cantley LC. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem* 1994;269:32358-67.
63. Moriya S, Kazlauskas A, Akimoto K, Hirai S, Mizuno K, Takenawa T, Fukui Y, Watanabe Y, Ozaki S, Ohno S. Platelet-derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:151-5.
64. Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 2000;32(1):3-18.
65. Anwer MS. Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *Hepatology* 2004;39:581-90.
66. Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J Biol Chem* 1998;273:1684-8.

67. Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett.* 1997;406:75-8.
68. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003;83:633-71.
69. Gillin H, McConkey M, Webster CR, Anwer SM. Role of PKC δ and PKC ϵ in the Reversal of Taurolithocholate-induced Internalization of Canalicular MRP2 by cyclic AMP. *Hepatology* 2004;40:211A.
70. Bolder U, Ton-Nu HT, Schteingart CD, Frick E, Hofmann AF. Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterology.* 1997;112:214-25.
71. Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ, Boyer JL. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology.* 1996;110:199-209.
72. Green RM, Beier D, Gollan JL. Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. *Gastroenterology.* 1996;111:193-8.
73. Konig J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 1999;29:1156-63.
74. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, Suchy FJ, Keppler D, Boyer JL. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology.* 1997;113:255-64.
75. Beuers U. Drug insight: Mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:318-28.
76. Hagey LR, Crombie DL, Espinosa E, Carey MC, Igimi H, Hofmann AF. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J Lipid Res* 1993;34:1911-7.
77. Beuers U, Fischer S, Spengler U, Paumgartner G. Formation of iso-ursodeoxycholic acid during administration of ursodeoxycholic acid in man. *J Hepatol* 1991;13:97-103.
78. Rust C, Beuers U. [Gallbladder and bile duct diseases]. *Med Monatsschr Pharm.* 2003;26:344-9.
79. Paumgartner G, Beuers U. Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:67-81, vi.
80. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol* 2001;35:134-46.

81. Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* 1998;28:1449-53.
82. Mitchell SA, Bansi DS, Hunt N, Von Bergmann K, Fleming KA, Chapman RW. A preliminary trial of high-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2001;121:900-7.
83. Beuers U, Spengler U, Kruis W, Aydemir U, Wiebecke B, Heldwein W, Weinzierl M, Pape GR, Sauerbruch T, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 1992;16:707-14.
84. Lindor KD. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. *N Engl J Med* 1997;336:691-5.
85. Corpechot C, Carrat F, Bahr A, Chretien Y, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2005;128:297-303.
86. Corpechot C, Carrat F, Bonnard AM, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000;32:1196-9.
87. Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:884-90.
88. Pares A, Caballeria L, Rodes J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology*. 2006;130:715-20.
89. Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000;31:1005-13.
90. Pardi DS, Loftus EV, Jr., Kremers WK, Keach J, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2003;124:889-93.
91. Colombo C, Battezzati PM, Podda M, Bettinardi N, Giunta A. Ursodeoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: a double-blind multicenter trial. The Italian Group for the Study of Ursodeoxycholic Acid in Cystic Fibrosis. *Hepatology* 1996;23:1484-90.
92. Essell JH, Schroeder MT, Harman GS, Halvorson R, Lew V, Callander N, Snyder M, Lewis SK, Allerton JP, Thompson JM. Ursodiol prophylaxis against hepatic complications of allogeneic bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998;128:975-81.

93. Jacquemin E, Hermans D, Myara A, Habes D, Debray D, Hadchouel M, Sokal EM, Bernard O. Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 1997;25:519-23.
94. Jazrawi RP, de Caestecker JS, Goggin PM, Britten AJ, Joseph AE, Maxwell JD, Northfield TC. Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 1994;106:134-42.
95. Poupon R, Poupon RE. Treatment of primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2000;14:615-28.
96. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, Lammert F, Stieger B, Meier PJ, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* 2001;121:170-83.
97. Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Fickert P, Diczfalusy U, Gumhold J, Silbert D, Fuchsbichler A, Benthin L, Grundstrom R, Gustafsson U, Sahlin S, Einarsson C, Trauner M. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans. *Gastroenterology* 2005;129:476-85.
98. Kurz AK, Graf D, Schmitt M, Vom Dahl S, Haussinger D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 2001;121:407-19.
99. Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology* 2001;33:1223-31.
100. Rodrigues C, Fan G, Wong P, Kren B, Steer C. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Molecular Medicine* 1998;4:165-178.
101. Benz C, Angermuller S, Otto G, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. *Eur J Clin Invest* 2000;30:203-9.
102. Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, Hylemon PB, Dent P. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology* 2002;35:779-89.
103. Sola S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT, Tanaka H, Steer CJ, Rodrigues CM. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005;42:925-34.
104. Guicciardi ME, Gores GJ. Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed. *J Hepatol* 2005;42:297-300.

105. Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* 1999;14:24-29.
106. Heuman DM, Bajaj RS, Lin Q. Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *J Lipid Res* 1996;37:562-73.
107. Lindor KD, Lacerda MA, Jorgensen RA, DeSotel CK, Batta AK, Salen G, Dickson ER, Rossi SS, Hofmann AF. Relationship between biliary and serum bile acids and response to ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1498-504.
108. Alpini G, Baiocchi L, Glaser S, Ueno Y, Marzioni M, Francis H, Phinizy JL, Angelico M, Lesage G. Ursodeoxycholate and tauroursodeoxycholate inhibit cholangiocyte growth and secretion of BDL rats through activation of PKC alpha. *Hepatology*. 2002;35:1041-52.
109. Marteau P, Chazouilleres O, Myara A, Jian R, Rambaud JC, Poupon R. Effect of chronic administration of ursodeoxycholic acid on the ileal absorption of endogenous bile acids in man. *Hepatology* 1990;12:1206-8.
110. Stiehl A, Raedsch R, Rudolph G. Acute effects of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acid on the small intestinal absorption of bile acids. *Gastroenterology* 1990;98:424-8.
111. Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K, Yamao J, Matsumura Y, Kubo R, Fukui H, Ishizaka S. Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology* 1992;16:358-64.
112. Calmus Y, Guechot J, Podevin P, Bonnefis MT, Giboudeau J, Poupon R. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes. *Hepatology* 1992;16:719-23.
113. Calmus Y, Gane P, Rouger P, Poupon R. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 1990;11:12-5.
114. Crawford JM, Strahs DC, Crawford AR, Barnes S. Role of bile salt hydrophobicity in hepatic microtubule-dependent bile salt secretion. *J Lipid Res* 1994;35:1738-48.
115. Haussinger D, Saha N, Hallbrucker C, Lang F, Gerok W. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem J* 1993;291:355-60.
116. Kubitz R, Sutfels G, Kuhlkamp T, Kolling R, Haussinger D. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* 2004;126:541-53.
117. Bouscarel B, Fromm H, Nussbaum R. Ursodeoxycholate mobilizes intracellular Ca²⁺ and activates phosphorylase a in isolated hepatocytes. *Am J Physiol* 1993;264:G243-51.

118. Chen YA, Duvvuri V, Schulman H, Scheller RH. Calmodulin and protein kinase C increase Ca(2+)-stimulated secretion by modulating membrane-attached exocytic machinery. *J Biol Chem*. 1999;274:26469-76.
119. Beuers U, Throckmorton D, Anderson M, Isales C, Boyer J. Tauroursodeoxycholic acid induces translocation of α -, but not δ -, ϵ -, and ζ -protein kinase C in rat hepatocytes. *Hepatology* 1993.
120. Bouscarel B, Gettys TW, Fromm H, Dubner H. Ursodeoxycholic acid inhibits glucagon-induced cAMP formation in hamster hepatocytes: a role for PKC. *Am J Physiol* 1995;268:G300-10.
121. Stravitz RT, Rao YP, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Jarvis WD, Hylemon PB. Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Am J Physiol* 1996;271:G293-303.
122. Milkiewicz P, Roma MG, Elias E, Coleman R. Hepatoprotection with tauroursodeoxycholate and beta muricholate against taurolithocholate induced cholestasis: involvement of signal transduction pathways. *Gut* 2002;51:113-9.
123. Kubitz R, Saha N, Kuhlkamp T, Dutta S, vom Dahl S, Wettstein M, Haussinger D. Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 2004;279:10323-30.
124. Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick G, Haussinger D. Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 2001;34:340-50.
125. Haussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, Vom Dahl S, Schliess F. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced cholestasis. *Gastroenterology* 2003;124:1476-87.
126. Wan QF, Dong Y, Yang H, Lou X, Ding J, Xu T. Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca²⁺. *J Gen Physiol* 2004;124:653-62.
127. Chen Y, Button B, Altenberg GA, Reuss L. Potentiation of effect of PKA stimulation of *Xenopus* CFTR by activation of PKC: role of NBD2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1436-44.
128. Zegers MM, Hoekstra D. Sphingolipid transport to the apical plasma membrane domain in human hepatoma cells is controlled by PKC and PKA activity: a correlation with cell polarity in HepG2 cells. *J Cell Biol*. 1997;138:307-21.
129. Toker A, Cantley L. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997;387:673-676.
130. Cantley L, Auger K, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991;64:281-302.

131. Stephens L, Smrcka A, Cooke F, Jackson T, Sternweis P, Hawkins P. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein bg subunits. . Cell 1994;77:83-93.
132. Van Haesebroeck B, Waterfield M. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Exp Cell Res 1999;253.
133. Toker A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. Mol Pharmacol. 2000;57:652-8.
134. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J Cell Sci. 2001;114:2903-10.
135. Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R, Wymann MP. Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. Science. 1998;282:293-6.
136. Misra S, Ujhazy P, Varticovski L, Arias IM. Phosphoinositide 3-kinase lipid products regulate ATP-dependent transport by sister of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 in bile canalicular membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:5814-9.
137. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. Mol Cell Biol. 1994;14:4902-11.
138. Joly M, Kazlauskas A, Fay FS, Corvera S. Disruption of PDGF receptor trafficking by mutation of its PI-3 kinase binding sites. Science. 1994;263:684-7.
139. Czech MP. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. Annu Rev Physiol 2003;65:791-815.
140. Misra S, Ujhazy P, Gatmaitan Z, Varticovski L, Arias IM. The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. J Biol Chem 1998;273:26638-44.
141. Kurz AK, Block C, Graf D, Dahl SV, Schliess F, Haussinger D. Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. Biochem J 2000;350 Pt 1:207-13.
142. Anwer MS, Gillin H, Mukhopadhyay S, Balasubramanian N, Suchy FJ, Ananthanarayanan M. Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. J Biol Chem. 2005;280:33687-92. Epub 2005 Jul 18.
143. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;278:G992-9.

144. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276:38610-8. Epub 2001 Aug 15.
145. Roelofsen H, Schoemaker B, Bakker C, Ottenhoff R, Jansen PL, Elferink RP. Impaired hepatocanalicular organic anion transport in endotoxemic rats. *Am J Physiol*. 1995;269:G427-34.
146. Bergmeyer H, Bernt E. Lactate dehydrogenase. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 3. New York: Academic Press Inc. 1983;1983:574-579.
147. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
148. Webster CR, Anwer MS. Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am J Physiol*. 1999;277:G1165-72.
149. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
150. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
151. Kubitz R, Haussinger D. Osmoregulation of bile formation. *Methods Enzymol* 2007;428:313-24.
152. Rust C, Beuers U. Medical treatment of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005;28:135-45.
153. Shi J, Wu C, Lin Y, Chen YX, Zhu L, Xie WF. Long-term effects of mid-dose ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1529-38.
154. Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: Mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002;36:525-31.
155. Glasova H, Berghaus TM, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid mobilizes alpha-PKC after uptake in human HepG2 hepatoma cells. *Eur J Clin Invest* 2002;32:437-442.
156. Bruck R, Nathanson MH, Roelofsen H, Boyer JL. Effects of protein kinase C and cytosolic Ca²⁺ on exocytosis in the isolated perfused rat liver. *Hepatology*. 1994;20:1032-40.
157. Bouscarel B, Kroll SD, Fromm H. Signal transduction and hepatocellular bile acid transport: cross talk between bile acids and second messengers. *Gastroenterology* 1999;117:433-52.

158. Benedetti A, Strazzabosco M, Ng OC, Boyer JL. Regulation of activity and apical targeting of the Cl-/HCO₃⁻ exchanger in rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:792-6.

7. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A.E.	Arbiträre Einheit
AIH	Autoimmunhepatitis
Akt	Serin-Threonin Kinase Akt = PKB
AMA	antimitochondriale Autoantikörper
ANCA	Anti-Neutrophilen Cytoplasmatische Autoantikörpern
ASBT	apical sodium dependent bile acid transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BIMI	Bisindolylmaleimid I
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	Bile salt export pump
CA	Cholsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CDNB	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
CF	Zystische Fibrose
cPKC	conventional PKC
CREB	cAMP response element binding protein
DCA	Deoxycholsäure
DMEM	Dulbeccos MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-buffered solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
Erk	Extracellular-signal regulated Kinase
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GLCA	Glycolithocholsäure
GS-DNP	2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion
GvHD	Graft versus host disease
HBSS	Hank's balanced salt solution

HEPES	N-(2 Hydroxyethyl)pirazin-N'-2 ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Horseradishperoxidase = Meerrettichperoxidase
IC50	Konzentration eines Hemmstoffes, bei der die halbmaximale Hemmung eines Enzyms erzielt wird
LCA	Lithocholsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelin Basic Protein
Mdr2	Multidrug resistance protein 2
Mdr3	Multidrug resistance protein 3
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MEKK	MEK-Kinase
MEM	Minimal essential medium
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Mrp1	Multidrug resistance-associated protein 1
Mrp2	Multidrug resistance-associated protein 2
MRP2	humanes Multidrug resistance-associated protein 2
Mrp3	Multidrug resistance-associated protein 3
MW	Mittelwert
NAD/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-kB	Nukleärer Transkriptionsfaktor kB
nPKC	novel PKC
Ntcp	Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide
Oatp	Organic anion transporting polypeptide
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate-buffered solution
PCREB	phosphoryliertes CREB
PDC-E2	E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes
PDK 1	Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1
PFIC	progressive familiäre intrahepatische Cholestase
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C

PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns-3,4,5-P	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PtdIns-3,4-P	Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat
PtdIns-3-P	Phosphatidylinositol-3-Monophosphat
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
ST	Staurosporin
Sulfo-NHS-SS-Biotin	Sufosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionat
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TLCA	Taurolithocholsäure
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure
WT	Wortmannin

8. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Simon Daniel H o h e n e s t e r
 Geburt: 23. Juni 1980 in München
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

Juni 2000 Allgemeine Hochschulreife (LKs: Biologie, Physik; Note 1,7)
 09/'91 - 06/'00 Besuch des Städt. Heinrich-Heine-Gymnasiums, München

Studium und Praktisches Jahr

04/'08 - 06/'08 Zweiter Abschnitt d. Ärztl. Prüfung (Note „sehr gut“) & Approbation
 11/'07 - 02/'08 PJ an der Chirurgischen Klinik Innenstadt, LMU München
 07/'07 - 10/'07 PJ an der Klinik für Anaesthesiologie, LMU München
 05/'07 - 06/'07 PJ am University of Chicago Medical Center, USA
 03/'07 - 04/'07 PJ an der Medizinischen Klinik II, LMU München
 09/'05 - 03/'06 Projektsemester mit experimentellen Arbeiten an der Promotion an der Tufts University, North Grafton, USA
 10/'01 - 05/'08 Studium der Humanmedizin an der LMU München

Dissertation

2003 - 2007 Anfertigung dieser Promotionsschrift im Labor von Prof. Dr. med. U. Beuers, Medizinische Klinik II, Klinikum der Universität München sowie im Labor von Prof. Dr. S. Anwer, Department of Biomedical Sciences, Tufts Cummings School of Vet. Medicine, North Grafton, USA.

Extracurriculäres Engagement

seit 05/'07 Konzeption und Implementierung eines Mentorenprogramms für die Medizinische Fakultät der LMU München
 seit 11/'00 Vorsitz des Vereins „DPSG Münchner Ebene e.V.“ (Dachorganisation der DPSG-Pfadfinderstämme Münchens, repräsentiert ca. 1000 Mitglieder)
 07/'98 - 12/'06 Jugendgruppenleitung im DPSG-Pfadfinderstamm St. Michael Perlach, zeitweise verantwortlich als Stammesvorsitzender

Stipendien

04/'04 - 05/'08 Stipendiat des Cusanuswerks - Begabtenförderung des BMBF unter Trägerschaft der Deutschen Bischofskonferenz
 05/'07 - 06/'07 Stipendiat der „Munich Harvard Alliance“ der LMU München für einen PJ-Aufenthalt an der University of Chicago
 03/'04 - 03/'06 Förderung der Doktorarbeit im Exzellenzprogramm der LMU „Promotionsstudium Molekulare Medizin“

9. DANKSAGUNG

Diese Dissertationsarbeit entstand in Ihrem Kern zwischen März 2003 und August 2007 im Labor von Herrn Prof. Dr. med. U. Beuers an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II - Großhadern der LMU München sowie im Labor von Herrn Prof. Dr. S. Anwer an der Tufts Cummings School of Veterinary Medicine der Tufts University, Boston, USA. Ihr Gelingen verdanke in großen Teilen der außergewöhnlichen Unterstützung der Mitarbeiter beider Laboratorien.

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt dabei Herrn Dipl.-Ing. Ralf Wimmer, ohne dessen großartige und unermüdliche Unterstützung diese Dissertationsarbeit in der vorliegenden Form nicht denkbar gewesen wäre. In alle Methoden der in München durchgeführten Versuche hat er mich sehr engagiert eingewiesen. So manche methodologische „Nuss“ konnten wir nur dank seines beispiellosen Engagements, seiner Beharrlichkeit und seines Erfindungsreichtums „knacken“ und so viele der Versuche erfolgreich zu Ende führen. Neben der maßgeblichen Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und seinem Beitrag bei Auswertung und Interpretation der Ergebnisse danke ich ihm besonders herzlich für die langjährige freundschaftliche Begleitung meiner Arbeit.

An meiner medizinischen Ausbildung genauso wie an meinem wissenschaftlichen Werdegang hat von Anfang an Herr PD Dr. med. Christian Rust punktuell aber prägend seinen Anteil gehabt. Dafür und insbesondere für sein Interesse an meinen Arbeiten in den USA und seine Unterstützung bei der Fortentwicklung dieser nur deskriptiven Vorergebnisse in München gilt ihm mein besonderer Dank.

Für sehr geduldige Unterstützung und Rat bei den Zellkulturversuchen danke ich auch meinem Freund Timo Vennegeerts.

Herrn Dr. med. Gerald Denk danke ich für die Hilfe beim Verfeinern der Perfusionstechnik, die stets kritische und konstruktive Begleitung bei der Interpretation der Versuchsergebnisse und die Zusammenarbeit bei der Veröffentlichung der gemeinsamen Daten.

Herrn PD Dr. med. Thomas Pusl danke ich herzlich für so manche sehr wohlthuende anerkennende, bei Bedarf aufmunternde oder freundschaftliche Geste zur rechten Zeit.

Zu Herrn Dr. med. Kris Bauchmüller empfinde ich trotz der nur kurzen Zeit, in der wir uns die Laborbank teilten, eine tiefe Verbundenheit. Ich danke ihm für die Begleitung durch Höhen und Tiefen der Dissertation ebenso wie des Medizinstudiums.

Frau Gudrun Schwertfeger ließ seit meinen ersten Tagen als Zivildienstleistender unser Labor für mich auch ein „zu Hause“ werden, dank Ihrer außergewöhnlich offenherzigen, fürsorglichen und interessierten Art. Dafür danke ich ihr herzlich. Verständnisvoll und aufmunternd teilte sie mit mir kleinere Enttäuschungen ebenso wie so manchen Erfolg.

Ganz besonders danke ich meinem langjährigen Mentor und Förderer Prof. Dr. Ulrich Beuers. Er hat mich vom ersten Tag unserer Zusammenarbeit an für die Medizin, den Beruf des Arztes und die Arbeit als Forscher begeistert und meine Entwicklung auf allen drei Feldern stets kritisch, fordernd und fördernd mit beispiellosem Engagement begleitet und geprägt. Ich danke ihm herzlich für das in mich gesetzte Vertrauen, für die Betreuung während der gesamten Dauer der Dissertation und die weit darüber hinaus gehende Unterstützung.

Prof. Dr. S. Anwer danke ich für die freundliche Einladung an seine Einrichtung und die Unterstützung während meines Aufenthaltes an der Tufts University. Hier half mir mit großer fachlicher Expertise und ungewöhnlichem Engagement Frau Prof. Dr. Cyndie Webster bei der Etablierung der isoformspezifischen PI3-Kinase Assays, sowie bei der Versuchsplanung und Ergebnisinterpretation. Ihr und vielen weiteren Mitarbeitern an der Tufts University, namentlich Frau Holly Jameson, Frau Anna Gates und Frau Dr. Dominique Penninck, verdanke ich eine prägende und lehrreiche Zeit in Neu England.

Diese Promotionsarbeit ist meinen Eltern gewidmet. Ihnen, meiner lieben Schwester, meiner Großmutter Leni und der ganzen Familie verdanke ich alle meine bisherigen bescheidenen Erfolge. Sie unterstützten mich in allen größeren und kleineren „Projekten“ meines Werdegangs stets vorbehaltlos und voller Vertrauen. Sie und ihren Rückhalt immer hinter mir zu spüren erlaubte mir erst, mich bis hier her zu entwickeln. Danke!