

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II –
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München-
Großhadern**

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Molekulare Mechanismen der Gallensäuren-
vermittelten Apoptoseinduktion und deren
transkriptionelle Modulation in einer humanen
Hepatomzelllinie**

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

vorgelegt von

Carina Anna Bernt

aus

Rosenheim

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Beuers

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schleicher

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. A. Eigler
Priv. Doz. Dr. J. Herrmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ch. Rust

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2006

Meinen Eltern

*"The pure and simple truth
is rarely pure and never simple."*

-Oscar Wilde

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2003 bis September 2005 im Labor für hepatobiliäre Forschung in der Medizinischen Klinik II des Klinikum Großhaderns, Ludwig-Maximilians-Universität München, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. U. Beuers und Herrn Dr. med. Ch. Rust angefertigt. Ohne die engagierte und tatkräftige Unterstützung meiner Betreuer und des gesamten Laborteams hätte die Arbeit nicht in dieser Form entstehen können. Deshalb möchte ich mich bei allen recht herzlich für die Hilfe und Diskussionsbereitschaft bedanken, die sowohl wissenschaftlicher als auch zwischenmenschlicher Art war.

Mein erster Dank gilt Herrn Timo Vennegeerts, der mich stets außergewöhnlich unterstützt hat. Die angenehme und effektive Teamarbeit mit ihm hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Herrn Ralf Wimmer möchte ich danken, dass er immer ein offenes Ohr und Zeit für meine Probleme hatte und diese oft mit konstruktiven Vorschlägen gelöst hat. Vor allem durch die freundschaftliche Wärme von Frau Gudrun Schwertfeger herrschte eine außergewöhnliche Atmosphäre im Labor, die die Arbeit enorm erleichterte und den Zusammenhalt förderte. Bedanken möchte ich mich selbstverständlich auch bei Frau Carola Drewnick und Herrn Simon Hohenester für die nette Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Meinen besonderen Dank möchte ich an meine Betreuer, Herrn Dr. med. Ch. Rust und Herrn Prof. Dr. med. U. Beuers, richten. Ihrer engagierten Betreuung und Unterstützung habe ich das Gelingen dieser Arbeit zu verdanken. Das positive Denken und die gute Laune von Herrn Dr. Rust halfen mir, meinen Spaß an der Forschung nie zu verlieren. Die intensive Diskussion der Ergebnisse mit Herrn Prof. Beuers rief viele neue, richtungsweisende Impulse hervor.

Ich danke allen für die herzliche Aufnahme ins Team, die außergewöhnliche Unterstützung und die entgegengebrachte Freundschaft.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1. Der Zelltod: Nekrose und Apoptose	10
1.2. Bedeutung der Apoptose für den Organismus	11
1.3. Molekulare Mechanismen der Apoptose	12
1.3.1. Caspasen	13
1.3.1.1. Funktion	13
1.3.1.2. Aktivierung der Caspasen	14
1.3.1.3. Inhibitoren der Caspasen.....	17
1.3.2. Bcl-2 Proteine	18
1.3.2.1. Struktur und Regulation der Bcl-2 Proteine	18
1.3.2.2. Funktion der Bcl-2 Proteine	20
1.3.3. Der extrinsische Reaktionsweg.....	22
1.3.4. Der intrinsische Reaktionsweg	23
1.3.5. Zusammenfassung der Reaktionswege bei der Apoptose	24
1.4. Apoptose und Leberkrankheiten	25
1.5. Cholestase	26
1.5.1. Therapie der Cholestase	27
1.5.2. Metabolismus der Gallensäuren.....	28
1.5.3. Hepatobiliäre Transportmechanismen.....	30
1.5.4. Apoptose und Cholestase	32
1.5.5. Adaption der Apoptose in Leberzellen bei chronischer Cholestase	32
1.5.6. Wirkung der Gallensäuren auf Induktion von Apoptose und Überlebenswegen in der Leberzelle	33
1.5.6.1. Gallensäuren-abhängige Apoptose in der Leberzelle.....	34
1.5.6.2. Gallensäuren-abhängige Überlebenswege in der Leberzelle.....	36
1.5.6.3. Zusammenfassung der Wirkung der Gallensäuren auf die Leberzelle.....	38
1.6. Sulfasalazin und Curcumin als Modulatoren intrazellulärer Signalwege	39
1.6.1. Sulfasalazin.....	39
1.6.2. Curcumin	41

1.7. Zielsetzung der Arbeit	43
2. Material und Methoden.....	44
2.1. Material	44
2.1.1. Chemikalien und Radiochemikalien	44
2.1.2. Verbrauchsmaterial	44
2.1.3. Plasmide	45
2.1.4. DNA-Oligonukleotide	46
2.1.5. Molekulargewicht- und Längenstandards	47
2.1.6. Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“).....	47
2.1.7. Enzyme	48
2.1.8. Puffer und Lösungen	48
2.1.9. Organismen und Zelllinien	52
2.1.9.1. Bakterien	52
2.1.9.2. Eukaryontische Zelllinien	52
2.1.10. Medien	52
2.1.10.1. Medien für Bakterien	52
2.1.10.2. Medien für eukaryontische Zellkultur.....	53
2.1.11. Antikörper.....	54
2.1.12. Sonstige Materialien und Geräte.....	55
2.2. Methoden.....	56
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	56
2.2.1.1. Nukleinsäurefällung.....	56
2.2.1.2. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	57
2.2.1.3. Präparation von Plasmid-DNA.....	57
2.2.1.4. Isolation von RNA aus eukaryontischen Zellen	57
2.2.1.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	58
2.2.1.6. Dephosphorylierung mit CIAP	58
2.2.1.7. Phosphorylierung von DNA mit PNK	58
2.2.1.8. Phosphorylierung und Hybridisierung von 2 komplementären Oligonukleotiden	59
2.2.1.9. Agarose-Gelelektrophorese	59
2.2.1.10. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	59
2.2.1.11. Ligation von DNA-Fragmenten.....	60
2.2.1.12. DNA-Sequenzierung.....	60
2.2.1.13. Klonierung in den RNAi-Expressionsvektor.....	60

2.2.1.14. Reverse Transkription	61
2.2.1.15. cDNA Synthese für die quantitative PCR	62
2.2.1.16. quantitative real-time PCR	62
2.2.1.17. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	65
2.2.1.18. Microarray	65
2.2.2. Prokaryontische Methoden	68
2.2.2.1. Herstellung kompetenter E.coli	68
2.2.2.2. Transformation durch Hitzeschock.....	69
2.2.3. Eukaryontische Methoden	69
2.2.3.1. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	69
2.2.3.2. Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zelllinien	70
2.2.3.3. Transfektion von eukaryontischen Zelllinien	70
2.2.3.4. [³ H]-Taurocholsäure-Aufnahme	73
2.2.3.5. Nachweis der Apoptose.....	73
2.2.3.6. Luciferase-Reportergen-Assay	74
2.2.3.7. Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen.....	75
2.2.4. Proteinchemische Methoden.....	75
2.2.4.1. Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	75
2.2.4.2. Isolierung von nukleären Proteinen	76
2.2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	76
2.2.4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	77
2.2.4.5. Coomassie-Färbung.....	78
2.2.4.6. Western-Blot	78
2.2.4.7. Immunocytologie	79
2.2.4.8. Electromobility shift assay (EMSA).....	80
2.2.5. Statistik	81
3. Ergebnisse	82
3.1. Molekularer Mechanismus der Gallensäuren-vermittelten	
Apoptoseinduktion.....	82
3.1.1. Gallensäuren induzieren Apoptose	82
3.1.2. Gallensäuren-vermittelte Apoptose in Fas-defizienten Zelllinien	84
3.1.3. Inhibierung der Caspase-8 Expression durch siRNA.....	89
3.1.3.1. siRNA-Expressionsplasmid pSUPER gegen Caspase-8	89
3.1.3.2. synthetische siRNAs gegen Caspase-8	94
3.1.4. Blockierung der Caspase-8 mit dem spezifischen Inhibitor Z-IETD-FMK.....	97

3.2. Transkriptionelle Modulation während der Gallensäuren-induzierten Apoptose	100
3.2.1. Einfluss von Sulfasalazin auf die GCDCA-vermittelte Apoptose	100
3.2.1.1. Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-vermittelte Apoptose	100
3.2.1.2. Sulfapyridin und 5-Aminosalicylsäure zeigen keinen Effekt auf die GCDCA-vermittelte Apoptose	106
3.2.1.3. Sulfasalazin inhibiert Gallensäuren-unabhängige Apoptose	108
3.2.1.4. Sulfasalazin aktiviert NF- κ B	109
3.2.1.5. Sulfasalazin moduliert die Aktivierung der MAPK (mitogen activated protein kinase)	111
3.2.2. Transkriptionsanalyse	113
3.2.2.1. Transkriptionsscreen: cDNA-Microarray	113
3.2.2.2. Quantitative RT-PCR	123
3.2.3. Einfluss von GCDCA auf die Expression von Bcl-X _L	137
3.2.4. Die Modulation von AP-1 während der GCDCA-vermittelten Apoptose	140
3.2.4.1. Effekt von GCDCA auf die AP-1 Aktivität in HepG2-Ntcp Zellen	140
3.2.4.2. Überexpression der AP-1 Komponenten und deren Auswirkung auf die AP-1 Aktivität und Apoptoseinduktion	143
3.2.4.3. Inhibition von AP-1 durch Curcumin verhindert die GCDCA-vermittelte Apoptose	145
4. Diskussion	150
4.1. Molekularer Mechanismus der Gallensäuren-vermittelten Apoptoseinduktion	151
4.1.1. Bedeutung des Fas-Rezeptors	152
4.1.2. Bedeutung anderer Todesrezeptoren und der Caspase-8	156
4.1.3. Bedeutung der Ergebnisse	160
4.2. Modulation der Transkription	162
4.2.1. Einfluss von Sulfasalazin auf die GCDCA-vermittelte Apoptose	163
4.2.2. Transkriptionsscreen und Bestätigung mittels quantitativer RT-PCR	167
4.2.3. Bcl-X _L	169
4.2.4. AP-1	169
4.2.5. Bedeutung der Ergebnisse	178
5. Zusammenfassung	179

6. Abkürzungsverzeichnis.....	182
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	187
8. Literaturverzeichnis.....	190
9. Lebenslauf.....	217
10. Publikationsliste	218

1. Einleitung

1.1. Der Zelltod: Nekrose und Apoptose

Der Zelltod und dessen Bedeutung sind schon seit langem bekannt. 1889 stellte Weissmann fest, dass die Konstruktion höherer Organismen nur durch die Gegenwart des „Keimes des Todes“ möglich sein konnte [226]. Bereits 1871 prägte Virchow den Begriff „Nekrose“, der sich von dem griechischen Wort „necrosis“, das „Tod, Tötung, Absterben“ bedeutet, ableitet und bis zur Entdeckung der Apoptose 1972 für alle Arten des Zelltodes verwendet wurde [217]. Beschrieben wurde die Apoptose das erste Mal als eine besondere Art des Zelltodes von den Pathologen John Kerr, Andrew Wyllie und Alastair Curie [97].

Nekrose bedeutet passives Sterben einer Zelle in Folge irreparabler Schädigung, wie physikalischer Verletzung oder Störung der Osmose. Die Zellen schwellen an, das Chromatin dekondensiert, lysosomale Enzyme werden freigesetzt und die DNA wird randomisiert gespalten. Es tritt Zellinhalt aus, der Entzündungsreaktionen hervorruft. Bis zu einem gewissen Grad der Schädigung ist die Nekrose reversibel und nicht letal, so dass zelluläre Degenerationen, wie Milchglaszellen, hydropische Zellschwellungen oder netzförmige Degenerationen und Mallory-Körperchen z.B. bei Leberkrankheiten im Gewebe entstehen können.

Apoptose hingegen steht für den aktiven, „physiologischen“ Zelltod, der nach einem genetisch festgelegten Programm abläuft. Der Begriff „Apoptose“ stammt ebenfalls aus dem Griechischen und besteht aus den Wörtern „apo“ und „ptosis“; „apo“ bedeutet „ab, los, weg“ und „ptosis“ „Senkung“. Es soll sinnbildlich das Abfallen welcher Blätter im Herbst beschreiben [97]. Die Apoptose wird von unterschiedlichen Stimuli, die von außerhalb oder innerhalb der Zelle kommen können, ausgelöst. Morphologisch beobachtet man das Schrumpfen der Zellen, den Abbau des Cytoskeletts und die damit verbundene Abrundung der Zellen. Des Weiteren erfolgen die Zerstörung der Mitochondrien und die Spaltung der DNA in etwa 180 bp große Fragmente. Zuletzt wird die Plasmamembran unter Bildung kleiner membranumhüllter Vesikel, den so genannten apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*), aufgelöst. In den apoptotischen Körperchen wandern Phospholipide und

Phosphatidylserin von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite. Dies verursacht die Phagozytose und den Abbau der apoptotischen Körperchen durch andere Zellen, vor allem Makrophagen. Die apoptotische Zelle eliminiert sich innerhalb weniger Minuten bis Stunden selbst, ohne dass Zellinhalt nach außen gelangt und inflammatorische Reaktionen ausgelöst werden.

1.2. Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Die Apoptose ist unerlässlich für die Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben und Organismen. Indizien für das Auftreten von Apoptose wurden bei Säugetieren, Fischen, Insekten, Nematoden, Cnidariern und sogar Pflanzen beobachtet [34, 49]. Ohne Apoptose und einem gezielten Absterben bestimmter Zellen könnte sich ein mehrzelliger Organismus weder entwickeln noch überleben [49]. Jede Zelle im Organismus benötigt je nach Differenzierung, Alter und Status eine bestimmte Kombination an Überlebensfaktoren, wie z.B. Cytokine, Hormone oder den direkten Zellkontakt. Fehlt ein Überlebensfaktor, wird die Apoptose ausgelöst. So wird der Organismus davor geschützt, dass falsch differenzierte, überflüssig gewordene oder Zellen am falschen Ort überleben können [130].

Während der Embryogenese sterben deshalb durch Apoptoseinduktion sowohl die Zellen im Inneren der Blastula ab, um die Gastrulation zu ermöglichen, als auch die Interdigitalzellen zwischen den sich entwickelnden freistehenden Fingern und Zehen [92, 132, 130]. Für die Ausbildung des Nervensystems ist die Apoptose ebenso bedeutend, da zunächst sehr viele Nerven- und Ganglionzellen ausgebildet werden. Es überleben allerdings nur die Zellen, die Kontakt zu anderen aufbauen und dadurch Signale zum Überleben bekommen. Die restlichen Zellen gehen in die Apoptose und hinterlassen genügend Platz für die Ausbildung weitreichender Verknüpfungen der überlebenden Zellen. Untersuchungen der Katzenretina zeigten, dass bis zu 80% der Ganglionzellen bis kurz nach der Geburt absterben, da sie keine Vernetzungen zu Nachbarn aufgebaut und deshalb auch keine neurotrophen Faktoren erhalten haben [130].

Doch auch der ausdifferenzierte Organismus schützt sich permanent durch Apoptoseinduktion, wie z.B. in infizierten bzw. gefährlichen, d.h. autoreaktiven oder transformierten Zellen. Cytotoxische T-Zellen erkennen infizierte Zellen, produzieren

und sezernieren daraufhin so genannte Todessignale, wie Fas-Ligand, TNF- α und Granzyme B. Diese induzieren Apoptose in den infizierten Zellen [130].

Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus kann am Auftreten schwerwiegender Erkrankungen, die durch eine Fehlregulation der Apoptose hervorgerufen werden, erahnt werden.

Sensibilisierung der Zellen gegenüber Apoptoseinduktion bedingt das Absterben von zu vielen Zellen, wie bei der Immundefizienzschwäche bzw. bei neurodegenerativen und neuromuskulären Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson [104].

Die Reduktion der Apoptoserate hingegen führt unter anderem zu Autoimmunerkrankungen oder Krebs. Bei Autoimmunerkrankungen überleben autoreaktive Immunzellen den Apoptosestimulus, den sie während des Reifungsprozesses bekommen. Sie gelangen daraufhin fälschlicherweise in den Organismus und greifen körpereigene Zellen an [23]. Die maligne Entartung und Krebsentwicklung ist nur durch die Inhibition der Apoptose möglich. Signale, wie Expression von Onkogenen, schlechte Versorgung mit Wachstumsfaktoren oder Verlust des Zell-Zell-Kontaktes induzieren normalerweise das Sterben durch Apoptose, so dass transformierte Zellen beseitigt werden und sich der Krebs nicht ausbreiten kann [233]. Vor allem Tumorzellen im Inneren von größeren Tumoren, die kaum mit Wachstumsfaktoren versorgt werden und metastasierende Zellen, die den Zell-Zell-Kontakt verlieren, erhalten Stimuli zur Apoptoseinduktion – und ignorieren sie.

1.3. Molekulare Mechanismen der Apoptose

Die molekularen Mechanismen der Apoptose sind evolutiv stark konserviert und unterscheiden sich wenig in den unterschiedlichen Organismen. Deshalb benutzt man *Caenorhabditis elegans* oft als Modellorganismus für die Untersuchung der Apoptose. Dieser Nematode besteht aus 1090 somatischen Zellen, von denen genau 131 während der Entwicklung in Apoptose gehen, so dass der adulte Hermaphrodit exakt 959 somatische Zellen besitzt. Die Konsequenzen eines *knock-outs* von bestimmten Genen sind schnell erkennbar und ermöglichen eine Einordnung dieser Gene in die komplexen Mechanismen der Apoptose. So entdeckte man die Proteine

CED-3, CED-4 und CED-9 von *C.elegans*. Durch hohe Homologien entschlüsselte man die Funktion der in Vertebraten vorkommenden Proteinfamilien der Caspasen (CED-3), der Bcl-2 Proteine (CED-9) und von Apaf-1 (CED-4) [200, 207, 228, 234].

Inzwischen ist eine Vielzahl von Proteinen bekannt, die an den sehr komplexen Reaktionswegen der Apoptose und deren Regulation beteiligt sind. Es ist davon auszugehen, dass noch lange nicht alle beteiligten Proteine identifiziert oder bekannt sind und die Funktion der schon erforschten Proteine noch nicht komplett verstanden ist. Man unterscheidet zwischen dem extrinsischen Signalweg, bei dem der Apoptosestimulus von außerhalb der Zelle über die so genannten Todesrezeptoren kommt, und dem intrinsischen, der von innerhalb der Zelle ausgelösten Apoptose. Diese beiden Reaktionswege existieren allerdings nicht autonom nebeneinander, sondern sind vielfach miteinander verbunden. In beiden Fällen sind die oben erwähnten Proteingruppen der Caspasen und der Bcl-2-Proteine unabdingbar, deshalb werden sie im Folgenden genauer betrachtet.

1.3.1. Caspasen

1.3.1.1. Funktion

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Substrate nach Aspartat schneiden (engl. *cystein aspartat specific proteases*) [2]. Diese Proteinklasse ist evolutiv stark konserviert. Man findet sie in allen Organismen, die zur Apoptose fähig sind. Die Proteine, die von Caspasen geschnitten werden, sind sehr vielfältig und verlieren nach der Proteolyse meist ihre Funktion. Einige wichtige Vertreter sind Lamin, Aktin und ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*). Nach Spaltung von Aktin und Lamin lösen sich die Kernmembran und das Cytoskelett auf. Die Proteolyse von ICAD bewirkt die Freisetzung von aktiver CAD, einer Caspase-abhängigen DNase, die die DNA zwischen den Nucleosomen in 180bp große Fragmente schneidet [51, 173]. Dies alles ruft die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose hervor [144, 161].

Man teilt die Caspasen in drei Gruppen ein [49, 198]:

- Initiatorcaspasen: ▪Caspase-8, -9, -10, -2
 ▪Funktion ist die Aktivierung der Effektorcaspasen

- Effektorcaspasen: ▪Caspase-3, -6, -7
 ▪Vermittlung des Zelltodes durch Proteolyse zellulärer Proteine

- restliche Caspasen: ▪Caspase-1, -4, -5, -11, -13, -14
 ▪bisher noch keine Verbindung zur Apoptose
 ▪Funktion u.a. bei Cytokinreifung

1.3.1.2. Aktivierung der Caspasen

Die Caspasen werden als Zymogene synthetisiert und sind erst nach der Proteolyse an Aspartat aktiv. Sie bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, einer großen (p20; 17-22 kD) und einer kleinen Untereinheit (p10; 10-24 kD). Nach der Aktivierung lagern sich zunächst die beiden Untereinheiten zu einem $\alpha\beta$ -Heterodimer zusammen. Anschließend bilden zwei Dimere ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer mit zwei katalytischen Zentren [49].

Da die Aktivierung der Caspasen den Zelltod zur Folge hat, muss diese genau kontrolliert werden. Man fand bisher drei unterschiedliche Aktivierungsmechanismen (siehe Abbildung 1).

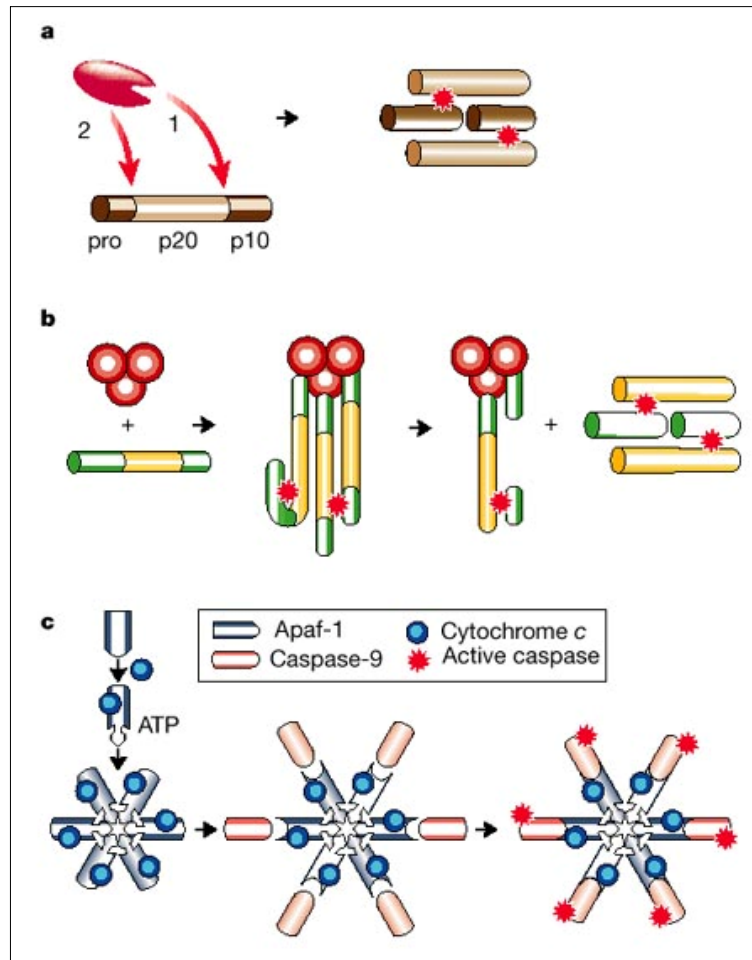


Abbildung 1: Mechanismen der Caspasenaktivierung. Die Proteolyse und Aktivierung der Caspasen wird **(a)** durch eine bereits aktivierte Caspase, **(b)** durch induzierte Nähe oder **(c)** durch Ausbildung eines Holoenzymkomplexes hervorgerufen (aus [76]).

Eine Möglichkeit der Aktivierung ist die Proteolyse an Aspartat durch eine schon aktive Caspase. Die Proteolyse erfolgt stets zwischen der p20- und der p10-Untereinheit, manchmal wird zusätzlich auch die N-terminale Prodomäne entfernt. Die Aktivierung von Caspasen durch Caspasen erfolgt kaskadenartig und dient sowohl der Amplifizierung eines proapoptotischen Signals als auch der Aktivierung der Effektorcaspasen durch die Initiatorcaspasen.

Doch wie werden die Initiatorcaspasen aktiviert? Durch induzierte Nähe oder Assoziation mit einem Adaptermolekül. Bei der induzierten Nähe kommen viele Moleküle der Procaspasen-8 oder -10 in hoher lokaler Konzentration vor, indem sie an dasselbe Molekül, wie z.B. FADD, binden. Die geringe Proteaseaktivität der noch nicht aktivierten Procaspase, die etwa 1% der prozessierten Caspase ausmacht,

reicht aus, um eine andere Procaspase zu schneiden und somit zu aktivieren. Danach kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung weiterer Caspasen [93, 140]. Andere Caspasen, wie Caspase-9, werden erst nach der Assoziation mit einer regulatorischen Untereinheit aktiv. Das cytosolische Protein Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) weist eine sehr kompakte Gestalt auf, da die N-terminale CARD-Domäne an die C-terminale WD40-Domäne gebunden ist. Durch die Induktion der Apoptose gelangt Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol. Cytochrom c bindet an die WD40 Domäne und verdrängt die CARD-Domäne. Das Molekül verliert die kompakte Struktur und wird länglicher. An die freie CARD-Domäne bindet Procaspase-9. dATP lagert sich an die daraufhin exponierte Nukleotid-bindende Domäne an und ermöglicht die Oligomerisierung mehrerer Apaf-1-Moleküle zu einem Heptamer, dem so genannten Apoptosom. Nach der Assoziation zum Oligomer wird die Procaspase-9 aktiviert, verbleibt als Caspase-9 im Apoptosom und schneidet weitere Caspasen, vor allem Effektorcaspasen wie Caspase-3 [234, 235].

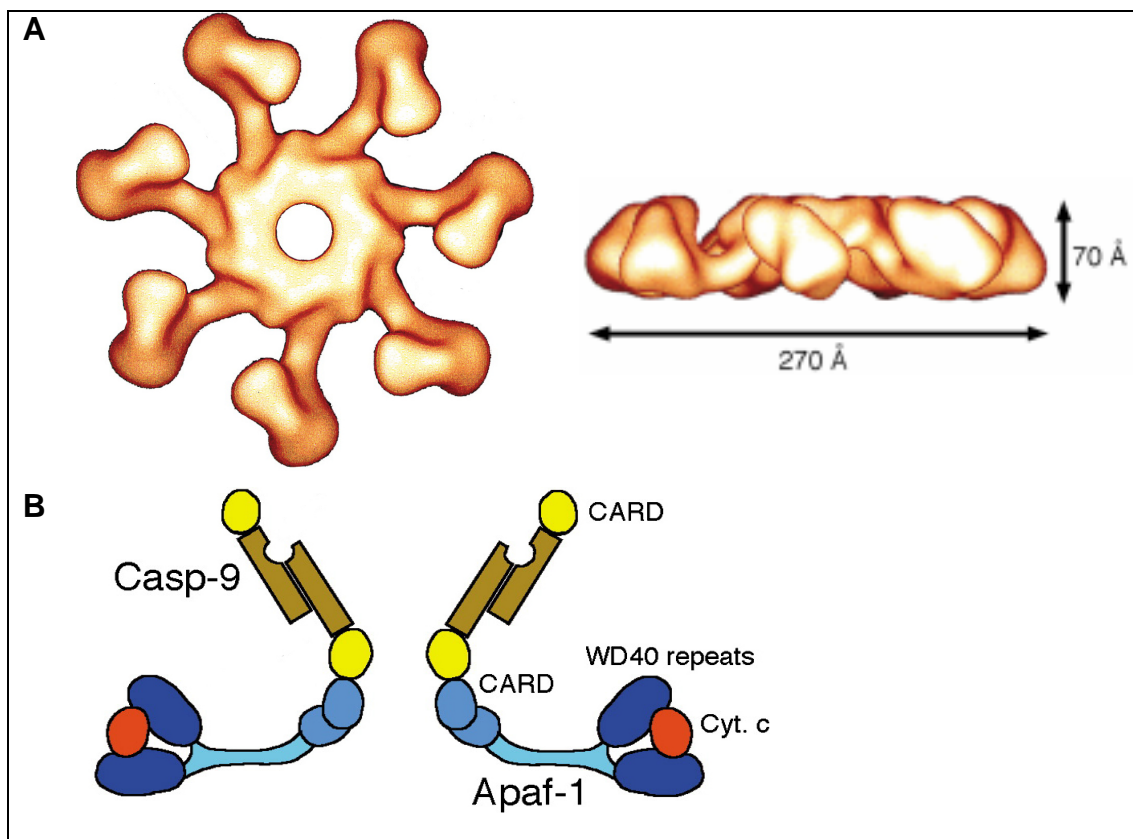


Abbildung 2: Das Apoptosom. (A) Zwei Ansichten des Apoptosomkomplexes. Das Apoptosom besteht aus einem Rad mit 7 Speichen, wobei jede Speiche einen Komplex aus Apaf-1/ Cytochrom c/ Caspase-9 darstellt. Den zentralen Ring bilden die CARD-Domänen. (B) Modell der molekularen Zusammensetzung des Komplexes aus Apaf-1/ Cytochrom c/ Caspase-9 (aus [189]).

1.3.1.3. Inhibitoren der Caspasen

Damit eine irrtümlich aktivierte Caspase die Apoptosekaskade nicht initiiert, gibt es Schutzmechanismen in der Zelle, die die Aktivität der Caspasen strikt regulieren. Diese Aufgabe übernimmt vor allem die Proteinklasse der IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*). Die IAPs und ihre bis dahin unbekanntenen BIR-Domänen (*baculoviral IAP repeat*) wurden zuerst im Baculovirus entdeckt, wo sie eine durch die Virusinfektion induzierte Apoptose unterdrücken [20, 36]. BIR-Domänen enthalten viele Histidine und Cysteine. Man vermutet, dass sie eine Art Zink-Finger-Struktur annehmen und als kompetitive Inhibitoren der Caspasen-3, -7 und -9 funktionieren, indem sie die BIR-Domäne ins katalytische Zentrum der Caspasen einlagern [21]. Es konnte allerdings keine Bindung an Caspase-1, -6, -8, -10 und CED3 festgestellt werden [35, 42, 169, 204]. Seit der Entdeckung der BIR-Domänen hat man viele Proteine mit diesen Domänen bei Viren, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Sus domesticus* und *Homo sapiens* entdeckt. Wahrscheinlich genügt das Vorhandensein einer einzigen BIR-Domäne, um Apoptose zu inhibieren. Die wichtigsten Vertreter der IAPs beim Säuger sind XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP und Survivin. Überexpression der IAPs inhibiert die Apoptoseauslösung durch TNF- α , Fas-Ligand, Staurosporin, Etoposide oder Wachstumsfaktorentzug [4, 47, 114, 120].

Um allerdings sicherzustellen, dass die IAP-Proteine eine notwendige Apoptose nicht verhindern, verfügt die Zelle über mehrere Systeme, wie z.B. Smac/DIABLO, die die IAPs inhibieren [46, 216]. Smac/DIABLO ist ein mitochondriales Protein, das durch die Permeabilisierung der Mitochondrien-Membran während der Apoptose ins Cytosol gelangt. Es bindet die IAPs an einer Oberflächengrube nahe der BIR-Domäne und inhibiert sie. Ein weiterer Mechanismus der IAP-Inaktivierung besteht im Entfernen des N-terminalen Endes der kleinen Untereinheit der aktivierten Caspase-9 durch die Caspase-3. Dieser Proteinabschnitt enthält die Bindestelle für die IAPs. So kann Caspase-9 zum einen nicht mehr inhibiert werden und zum anderen werden freie IAPs durch die freigesetzten Prodomänen eingefangen, damit sie keine weiteren Caspasen inhibieren können [29, 122, 196].

1.3.2. Bcl-2 Proteine

Die Bcl-2 Proteine sind Schlüsselregulatoren bei der Apoptose. Sie kontrollieren den Austritt der proapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c oder Smac/DIABLO, aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Sobald diese Faktoren ins Cytosol gelangen, werden Caspasen aktiviert und das Selbstmordprogramm der Zelle wird irreversibel ausgeführt.

1.3.2.1. Struktur und Regulation der Bcl-2 Proteine

Das Bcl-2 Protein wurde zuerst als Proto-Onkogen an der Chromosomenbruchstelle t(14;18) in B-Zell-Lymphomen entdeckt. Seitdem wurden viele pro- und antiapoptotisch wirkende Proteine gefunden und der Bcl-2 Familie zugeordnet (siehe Abbildung 3) [145]. Die wichtigsten antiapoptotischen Bcl-2 Proteine in Säugern sind Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 und A1. Die proapoptotischen Vertreter sind vor allem Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bid und Bik.

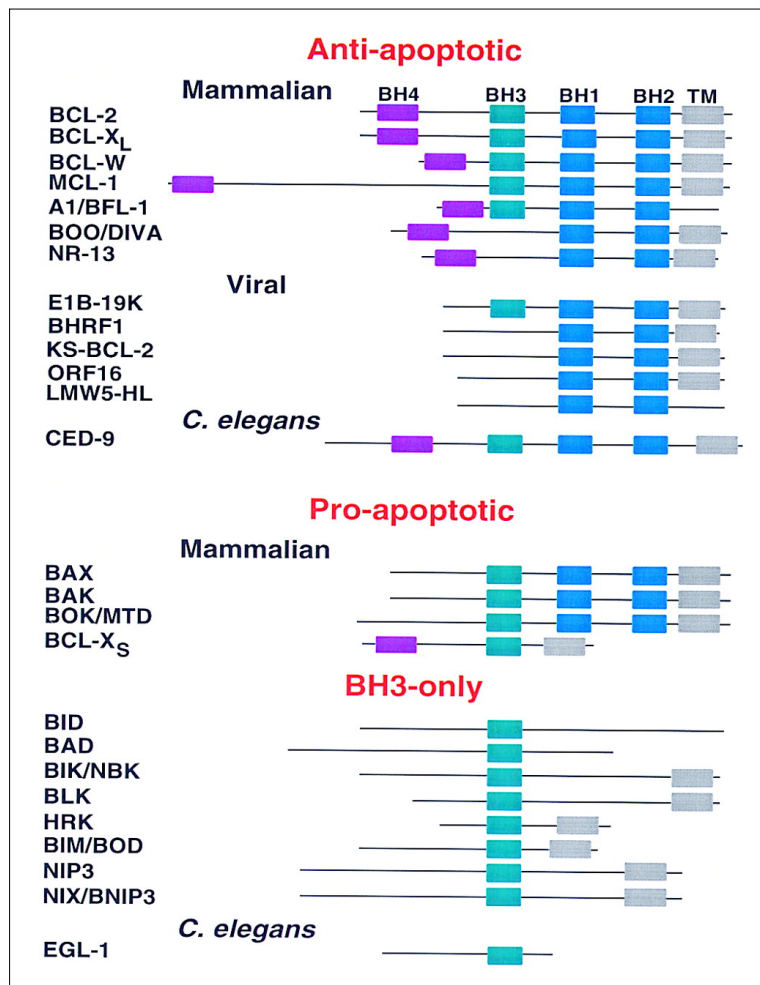


Abbildung 3: Liste der Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie. BH-Domänen BH1-BH4 (*Bcl-2 homology*) und C-terminale Transmembrandomänen (TM) sind entsprechend gekennzeichnet (aus [70]).

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie zeichnen sich neben der Sequenzhomologie, die vor allem in den Bereichen der BH (*Bcl-2 homology*)-Domänen auftritt, durch 3 Merkmale aus [74]:

- Fähigkeit, konstitutiv oder induzierbar in der äußeren Mitochondrien-, der äußeren Kern- oder der Endoplasmatischen Retikulum- Membran lokalisiert zu sein
- Fähigkeit, Homo- und Heterodimere mit Proteinen zu bilden, die eine BH3-Domäne besitzen
- Fähigkeit, Kanäle in synthetischen Membranen zu bilden (gilt nicht für *BH3-only*-Proteine)

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie besitzen bis zu vier BH-Domänen mit α -helikaler Struktur [1, 163]. Viele Bcl-2 Proteine weisen außerdem eine hydrophobe Transmembrandomäne am C-Terminus auf, die wichtig für die Lokalisation an Membranen sind [143]. Ohne Apoptosestimulus sind die antiapoptotischen Bcl-2 Proteine meist an der äußeren Membran der Mitochondrien, aber auch an der Kernmembran und der Membran des ER, lokalisiert [41, 84]. Die proapoptotischen Bcl-2 Proteine weisen ohne Apoptosestimulus meist eine Lokalisation im Cytosol oder an Komponenten des Cytoskeletts gebunden auf [86, 153].

Nach einem Apoptosesignal werden die proapoptotischen Proteine aktiviert; sie ändern ihre Konformation und translozieren zur Mitochondrienmembran.

1.3.2.2. Funktion der Bcl-2 Proteine

Wie regulieren die Bcl-2 Proteine den Austritt der proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien? Als Antwort auf diese Frage gibt es verschiedene Modelle, wobei derzeit noch keines allgemein akzeptiert wird [76]. Die Grundlage aller Modelle ist die Fähigkeit der Bcl-2 Proteine, Homo- und Heterodimere bilden zu können. Wenn nun ein anti-apoptotisches Protein mit einem proapoptotischen Protein interagiert, wird die Wirkung des proapoptotischen Proteins inhibiert [70]. Ob proapoptotische Faktoren aus den Mitochondrien austreten, hängt folglich von dem Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen ab.

Modell 1: Bcl-2 Proteine bilden Kanäle in der äußeren Mitochondrien-Membran

Bcl-X_L weist eine große Ähnlichkeit zur porenbildenden Untereinheit des *Diphtheria toxin* auf [138]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Bcl-2, Bcl-X_L und Bax durch Oligomerisierung Kanäle in synthetischen Membranen bilden können [178, 179]. Bax und Bak können *in vivo* Kanäle bilden [7, 69]. Allerdings wurde noch nicht nachgewiesen, dass diese Kanäle groß genug für den Transport der entsprechenden Proteine sind [76].

Modell 2: Bcl-2 Proteine interagieren mit bereits bestehenden Kanälen

Da Bcl-2 Proteine mit unterschiedlichen Proteinen interagieren können, besteht auch die Möglichkeit, dass sie an Proteine in der äußeren Mitochondrien-Membran binden und somit schon bestehende Poren öffnen [162]. Ein wichtiger Kandidat bei diesem

Modell ist der spannungsabhängige Anionen-Kanal (VDAC), da Bcl-2 Proteine an diesen Kanal binden und dessen Aktivität regulieren können [190]. Allerdings ist die charakteristische Porengröße des VDAC-Kanals zu klein, um die proapoptotischen Faktoren passieren zu lassen, weshalb man eine Konformationsänderung nach der Bindung des Bcl-2 Proteins postuliert [76].

Modell 3: Bcl-2 Proteine stören die Homöostase der Mitochondrien

Viele Experimente haben gezeigt, dass Bcl-2 Proteine die Homöostase der Mitochondrien beeinflussen können - sie vielleicht sogar regulieren [74]. Durch die Störung der Homöostase der Mitochondrien verändern sich z.B. pH-Wert oder Redoxpotential. Daraufhin öffnet sich die PT- (*permeability-transition*) Pore, die sehr groß ist und beide Membranen durchspannt. Dadurch wird das Mitochondrium stark depolarisiert und die Matrix schwillt an. Da die Oberfläche der inneren Membran viel größer ist als die der äußeren, kann das Anschwellen der Matrix die äußere Membran zerstören [67, 75].

Ohne genau den Mechanismus des Austritts von Cytochrom c und der anderen Faktoren zu kennen, wird postuliert, dass die proapoptotischen Proteine, die sich an unterschiedlichen Loci in der Zelle befinden, als so genannte „Sensoren“ fungieren, die bestimmte Zellschädigungen registrieren, daraufhin die Konformation ändern, zu den Mitochondrien translozieren und durch Efflux der proapoptotischen Faktoren Apoptose auslösen [223]. Das Bcl-2 Protein Bim etwa reagiert auf Schädigungen der Mikrotubulifunktion, Bmf registriert den Verlust der Substratadhäsion, Bid antwortet auf die geringste Aktivität von Caspase-8 und Bad begegnet dem Verlust von Überlebensfaktoren und metabolischen Stress mit seiner Aktivierung [71, 153, 154]. In manchen Fällen werden Apoptosestimuli auch von anderen „Sensoren“ bemerkt, die dann die Expression von proapoptotischen Proteinen initiieren, wie beispielsweise nach Schädigung der DNA. ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) oder DNA-PK (*DNA protein kinase*) registrieren die DNA-Schädigung und phosphorylieren p53. p53 induziert daraufhin v.a. die Expression des proapoptotischen Proteins Puma [166].

1.3.3. Der extrinsische Reaktionsweg

Bei dem extrinsischen bzw. rezeptorvermittelten Reaktionsweg kommt der Apoptosestimulus von außen (siehe Abbildung 4). Dabei binden Faktoren wie Fas-Ligand, TNF- α (*tumor necrosis factor α*) oder TRAIL (*TNF related apoptosis-inducing ligand*) an die entsprechenden Oberflächenrezeptoren Fas/CD95, TNF- α -Rezeptor 1, sowie die TRAIL-Rezeptoren 1 (DR4) und 2 (DR5). Diese Rezeptoren werden Todesrezeptoren (*Death receptors*) genannt [176].

Die Ligandenbindung induziert die Ausbildung des DISC-Komplexes (*death-inducing signalling complex*) an der cytosolischen Seite. Der Rezeptor oligomerisiert, daraufhin lagert sich das Adaptermolekül FADD (*Fas-associated death domain protein*) mit seiner DD (*death domain*) an die DD des Rezeptors an. Die Bindung von FADD an den TRAIL-Rezeptor wird durch ein weiteres Adaptermolekül, TRADD (*TNF receptor associated death domain protein*), vermittelt. Diese Adaptermoleküle weisen zusätzlich zu den DDs auch DEDs (*death effector domain*) auf. An diese DED lagern sich viele Procaspasen-8 und -10 an, die sich durch die induzierte räumliche Nähe gegenseitig aktivieren. Aktive Caspase-8 verlässt den Komplex und aktiviert weitere Proteine, vor allem Caspasen, wie die Effectorcaspasen-3 und -7 [10, 174]. Caspase-3 spaltet daraufhin v.a. Aktin, Lamin oder ICAD (*inhibitor of CAD*). Dies hat zur Folge, dass das Cytoskelett und die Kernmembran aufgelöst werden und die DNase CAD aktiviert wird, die dann die DNA fragmentiert. Die Zelle geht in die Apoptose.

Die Regulation des extrinsischen Weges erfolgt durch eine Vielzahl von Proteinen. Wichtige Inhibitoren der rezeptorvermittelten Apoptose sind unter anderem die IAPs (siehe 1.3.1.3. Inhibitoren der Caspasen) und c-FLIP (*Fas associated death domain-like ICE-inhibitor protein*). cFLIP besitzt zwei DED-Domänen, kann sich an FADD anlagern und verhindern, dass Procaspase-8 bindet. c-Flip ist den Caspasen sehr homolog. Es wird durch aktive Caspase-8 ebenfalls in eine p20 und p10-Untereinheit gespalten, die katalytische Domäne von cFLIP ist allerdings nicht aktivierbar. cFLIP-Proteine verhindern somit die Bindung und Aktivierung von Caspase-8 an den DISC-Komplex [177].

Neben den Inhibitoren gibt es auch Apoptose-verstärkende Proteine, die durch die rezeptorvermittelte Apoptose aktiviert werden. Ein Beispiel dafür ist das Bcl-2 Protein Bid. Bid wird von der Caspase-8 geschnitten, woraufhin t-Bid (*truncated*) zu den Mitochondrien transloziert und den mitochondrialen bzw. intrinsischen Weg aktiviert.

1.3.4. Der intrinsische Reaktionsweg

Beim intrinsischen Weg spielen die Mitochondrien die zentrale Rolle (siehe Abbildung 4). Die Zelle erhält hierbei den Stimulus zur Apoptoseinduktion meist intrazellulär, wie z.B. nach DNA-Schädigung. Der intrinsische Weg kann aber auch durch die Kopplung mit dem extrinsischen Weg, z.B. über t-Bid, aktiviert werden.

Die Zelle verfügt über unterschiedliche Sensoren, die sowohl an den Organellen als auch im Cytosol lokalisiert sind. Nachdem diese Sensoren Signale zur Apoptoseauslösung empfangen haben, aktivieren sie die Bcl-2 Proteine [166]. Die Bcl-2 Proteine permeabilisieren die Mitochondrienmembran (siehe 1.3.2.2.). Dies ermöglicht den Austritt von vielen proapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c oder Smac/DIABLO [76, 105]. Cytochrom c verursacht die Ausbildung des Apoptosoms mit Aktivierung der Initiatorcaspase-9 [116]. Caspase-9 proteolysiert u.a. die Effektorcaspasen-3 und -7, die letztendlich zum Zelltod führen. Smac/DIABLO unterstützt die Apoptose, indem es mit den IAPs interagiert und sie an der Inhibition aktiver Caspasen hindert. Somit führt der Austritt der proapoptotischen Faktoren zum Zelltod.

1.3.5. Zusammenfassung der Reaktionswege bei der Apoptose

Die nachfolgende Abbildung zeigt die wichtigsten Reaktionen der Apoptose im Überblick.

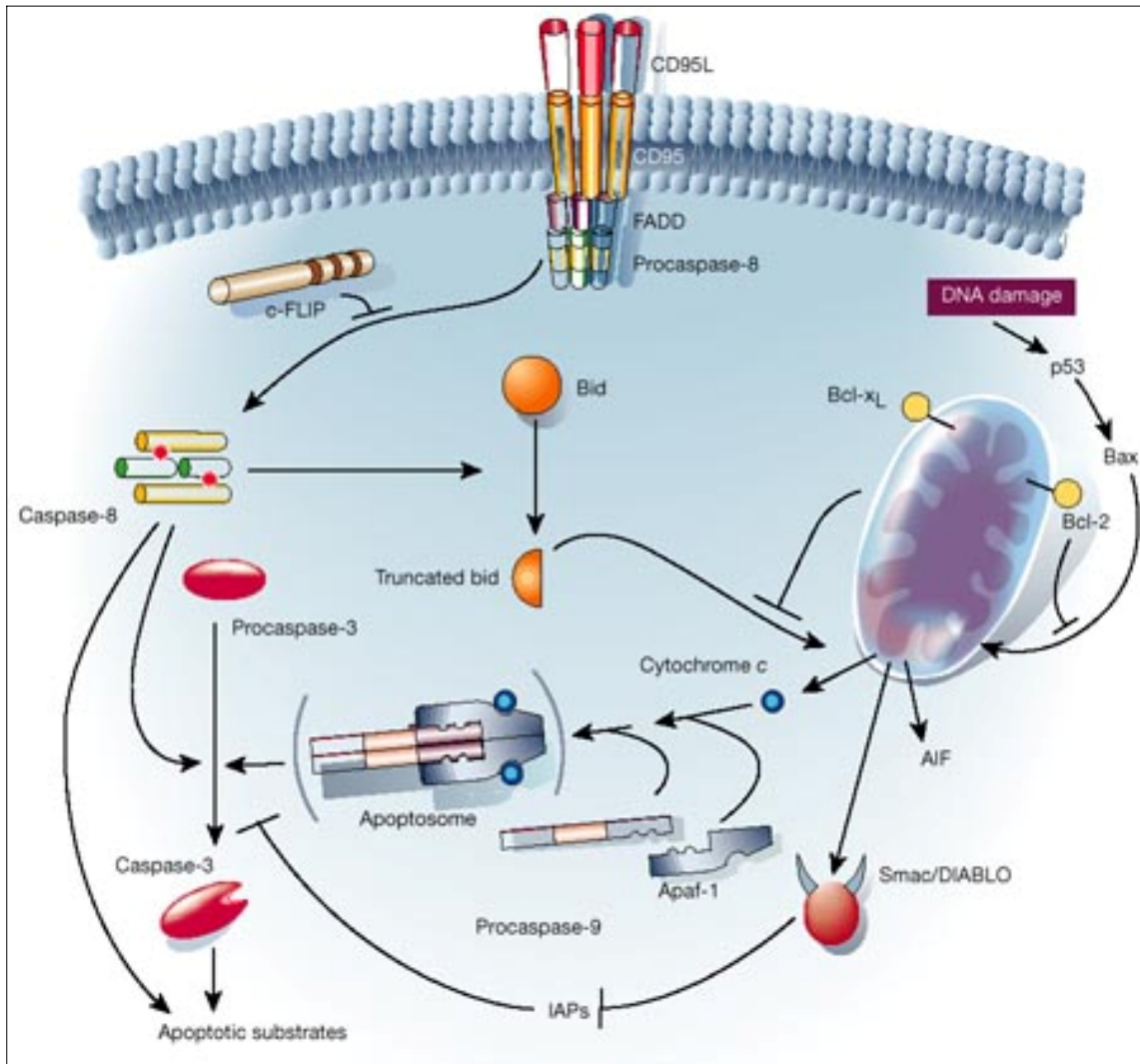


Abbildung 4: Überblick über die wichtigsten Signalwege der Apoptose in Säugerzellen. Der Rezeptor-vermittelte Weg (links) wird von den Todesrezeptoren, wie Fas/CD95, ausgelöst, nachdem der entsprechende Ligand (z.B. Fas/CD95-Ligand) gebunden hat. Es bildet sich der DISC-Komplex, indem ein Adaptermolekül (FADD) an die cytosolische Domäne des Rezeptors bindet. Das Adaptermolekül bindet viele Procaspase-8-Moleküle, die durch induzierte Nähe aktiviert werden. Die Rekrutierung von Caspase-8 kann durch das Caspase-Homologe c-FLIP inhibiert werden. Der mitochondriale Weg (rechts) wird durch unterschiedliche Stimuli, wie z.B. DNA-Schädigung ausgelöst. Dabei werden meist proapoptotische Bcl-2 Proteine wie Puma, Bid, Bax und Bak aktiviert, die dann zu den Mitochondrien translozieren. Dort interagieren die pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteine. Wenn die proapoptotischen Proteine überlegen sind, treten proapoptotische Faktoren, wie Cytochrom c, Smac/DIABLO und AIF (*apoptosis-inducing factor*), aus dem Intermembranraum aus. Mit Hilfe von Cytochrom c bildet sich das Apoptosom mit aktiver Caspase-9 aus, Smac/DIABLO hindern die IAPs an der Inhibition der aktiven Caspase-3, -7 und -9. Über Bid sind beide Wege miteinander verbunden (aus [76]).

Die Abbildung 4 zeigt nur die wichtigsten Moleküle und das Grundgerüst der bisher entdeckten Signalwege. In Wirklichkeit ist die Regulation sehr viel komplexer. Man geht davon aus, dass viele bis heute zum Teil noch unentdeckte Proteine die Vorgänge der Apoptose beeinflussen.

Zusätzlich zu den gezeigten Wegen gibt es noch weitere, auch Caspase-unabhängige Apoptosemechanismen. Zwei Beispiele für Caspase-unabhängige Apoptose hat man bereits identifiziert: AIF und EndoG [92].

AIF (*apoptosis inducing factor*), ein Protein aus dem Intermembranraum der Mitochondrien mit Homologien zur bakteriellen Oxidoreduktase, lokalisiert nach dem Austritt aus dem Mitochondrium in den Kern. Dort löst es Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung unabhängig von einer Aktivierung der Caspasen aus [133, 201]. Durch *knock-out* Versuche bei Mäusen wurde festgestellt, dass AIF sehr wichtig für die Embryogenese, vor allem bei der Gastrulation, ist [92].

EndoG, eine Nuklease mit einer Substratspezifität für GC-reiche Sequenzen, transloziert ebenfalls nach dem Austritt aus dem Mitochondrium in den Nukleus. Dort verursacht EndoG eine Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung [115, 208, 224].

1.4. Apoptose und Leberkrankheiten

Leberkrankheiten verursachen den Zelltod spezifischer Leberzellen. Bei den meisten Erkrankungen sterben die Hepatozyten ab. Nach manchen Erkrankungen kann die Leber wieder vollständig regenerieren. Ob die Hepatozyten bei den jeweiligen Lebererkrankungen durch Nekrose oder Apoptose sterben, ist noch nicht endgültig geklärt und wird stark diskutiert. Die Majorität der Wissenschaftler unterstützt die Hypothese, dass die Hochregulation der Apoptoserate bei alkoholinduzierter Leberschädigung, viraler Hepatitis, Fettleberhepatitis, Ischämie, Morbus Wilson und Cholestase an dem Entstehen und Fortschreiten der Krankheit beteiligt ist. Außerdem scheint die Reduktion der Apoptoseinduktion, unter anderem durch p53-Mutation, mit der Transformation von Leberzellkarzinomen assoziiert zu sein [126, 171, 230].

Bei der Erforschung des Zusammenhanges zwischen bestimmten Lebererkrankungen und Apoptose stehen Wissenschaftler vor dem großen Problem,

dass nur begrenztes Patientenmaterial zur Verfügung steht und man in der Regel auf mehr oder weniger geeignete Tiermodelle oder Zellkulturmodelle zurückgreifen muss, in denen die Lebererkrankungen simuliert werden. Allerdings weisen diese Modelle oft große Unterschiede zu der Krankheit *in vivo* auf. Zudem muss man beim Nachweis der Apoptose in Gewebeproben von Patienten oder aus Tierversuchen beachten, dass die Apoptose zum einen ein sehr schneller Prozess ist, der nach wenigen Minuten bis Stunden mit der Elimination der apoptotischen Zelle durch Phagozytose der apoptotischen Körperchen von umliegende Zellen abgeschlossen ist. Die gestorbene Zelle wird meist innerhalb kürzester Zeit ersetzt, der Umbau des Lebergewebes erfolgt sehr schnell. So ist die Apoptose nur zeitlich sehr begrenzt nachzuweisen. Zum anderen induzieren normalerweise nur Einzelzellen Apoptose, die zudem schwer zu identifizieren sind. Bei der Nekrose hingegen sterben ganze Zellareale ab, die histologisch auffällig sind. Des Weiteren sollte bei der Beurteilung, ob Apoptose oder Nekrose stattgefunden haben, beachtet werden, dass noch keine gesicherten Daten über die Morphologie der Apoptose *in vivo* vorhanden sind. Es ist möglich, dass sich apoptotische Zellen *in vivo* durch die Einflüsse im Gewebeverband, wie Cytokine, Hormone, Zell-Zell-Kontakte, von apoptotischen Zellen *in vitro* unterscheiden [72].

Trotz der experimentellen Schwierigkeiten gibt es viele Indizien und Beweise, dass die Apoptose bei den oben genannten Lebererkrankungen von Bedeutung ist. Das Zusammenspiel der Cholestase mit der Apoptose wird in Kapitel 1.5.4. eingehender erläutert.

1.5. Cholestase

Cholestase beschreibt eine Beeinträchtigung des Gallenflusses, die zum einen zur Retention gallenpflichtiger Substanzen im Blut und in der Leber und zum anderen zum Mangel funktionell wichtiger Gallenbestandteile im Darm führt. Die Akkumulation hydrophober Gallensäuren wird als Hauptursache für die Schädigung der Hepatozyten und Cholangiozyten angesehen [90]. Cholestase tritt bei vielen Leberkrankheiten auf. Sie ist v.a. bei den chronisch cholestatischen Erkrankungen, wie der primär biliären Zirrhose (PBC) und der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), bedeutend. Die chronisch cholestatischen Lebererkrankungen verlaufen unbehandelt progredient, die zunehmende Fibrogenese führt in der Regel innerhalb

5-12 Jahren zur Leberzirrhose. Falls die Beeinträchtigung der Leberfunktion durch die Zirrhose nicht mehr durch intakte Hepatozyten kompensiert werden kann, treten Komplikationen wie portale Hypertonie, Aszites, Varizenblutung, gastrointestinale Blutungen, hepatische Enzephalopathie und hepatorenales Syndrom auf, die ohne Lebertransplantation häufig zum Tode führen [62].

1.5.1. Therapie der Cholestase

Die Therapie bei chronisch cholestatischen Lebererkrankungen besteht aus der Gabe von Ursodeoxycholsäure (UDCA; 13-20 mg/kg/d), einer physiologischen Gallensäure, die beim gesunden Menschen etwa 3% des Gesamtgallensäurepools ausmacht. Sie ist die dominante Gallensäure in der Schwarzbärogalle, die schon in der traditionellen chinesischen Medizin seit Langem zur Behandlung von Lebererkrankungen verwendet wird [73]. Seit etwa 30 Jahren wird UDCA aufgrund ihrer litholytischen Eigenschaft zur Behandlung von Cholesteringallensteinen eingesetzt; ab 1989 fand sie in vielen Studien zur Therapie von chronisch cholestatischen Erkrankungen, wie PBC und PSC, Verwendung. Aufgrund ihres positiven therapeutischen Effekts und der guten Verträglichkeit wird sie heutzutage als Medikament angewendet. UDCA verbessert die Serumleberwerte und die Leberhistologie bei PBC-Patienten. Sie verzögert die Ausbildung der Leberzirrhose, verringert die Komplikationen einer Leberzirrhose und verlängert das transplantatfreie Überleben [16]. Gabe von UDCA verschiebt das Verhältnis der hydrophoben und hydrophilen Gallensäuren zugunsten der weniger toxischen hydrophilen.

Die Wirkungsmechanismen der UDCA sind noch nicht vollständig entschlüsselt; es werden mindestens drei unterschiedliche postuliert. Zum einen fördert UDCA die Ausbildung von gemischten Mizellen mit Phospholipiden, die zum Schutz der Cholangiozyten vor den hydrophoben Gallensäuren beitragen. Außerdem scheint UDCA die Konzentration der hydrophoben Gallensäuren in den Cholangiozyten zu reduzieren [17, 18]. Zum anderen stimuliert UDCA die hepatobiliäre Sekretion durch Aktivierung von vorhandenen Transportern oder verstärkten Einbau von Transportproteinen in die kanalikuläre Membran (siehe Abbildung 6). Diese Vorgänge könnten über Ca^{2+} -, PKC-, p38-MAPK- oder/und Erk 1/2- abhängige

Signalwege vermittelt werden [15, 54, 109, 180]. Als letztes kann UDCA vor Gallensäuren-induzierter Apoptose schützen. Dabei aktiviert UDCA Überlebenssignalwege über EGFR (*epidermal growth-factor receptor*) und MAPK [156]. Zusätzlich scheint UDCA die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsporen zu erschweren [167].

1.5.2. Metabolismus der Gallensäuren

Die Galle besteht zu 82% aus H₂O und 18% aus Soluta. Die gelösten Substanzen setzen sich aus 25% Cholsäure, 25% Chenodeoxycholsäure, 12,5% Deoxycholsäure, wenige Prozent Lithocholsäure und Ursodeoxycholsäure, 22% Phospholipide, 4% Cholesterin, 4% Proteine und 0,3% Glucuronyl-konjugiertes Bilirubin zusammen. Die Gallensäuren liegen in der Galle als Gallensalze mit Na⁺ oder K⁺ als Gegenionen vor. Die Gallensalze bilden Mizellen und schließen hydrophobe Substanzen, wie Cholesterin, ein.

Die primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) werden in den Hepatozyten aus Cholesterin durch Hydroxylierung an C₇ am glatten endoplasmatischen Retikulum durch Cholesterin-7 α -Hydroxylase und durch weitere Hydroxylierungen und Seitenkettenverkürzungen in den Mitochondrien und Peroxysomen synthetisiert (siehe Abbildung 5). Die Gallensäuren werden mit Glycin oder Taurin konjugiert, wobei das Verhältnis Glycinkonjugate zu Taurinkonjugaten gleich 3 zu 1 ist. Sie werden durch ATP-abhängige Transportmechanismen an der kanalikulären Membran in die Gallenkanaliculi sezerniert und zu den Gallengängen in den Portalfeldern geleitet. Von dort wird die Primärgalle unter Modifizierung durch das Gallengangssystem in die Gallenblase und den Darm transportiert.

Enteral werden die primären Gallensäuren durch Mikroorganismen dekonjugiert und zu sekundären Gallensäuren verstoffwechselt. Cholsäure (CA) wird durch die 7- α -Dehydroxylase zur Deoxycholsäure (DCA), die Chenodeoxycholsäure (CDCA) zur Lithocholsäure (LCA) umgewandelt. Zusätzliche Oxidation der CDCA an C₇ lässt die 7-Keto-Lithocholsäure entstehen. Die Gallensäuren werden über Na-abhängige Transportsysteme enteral resorbiert und an Albumin und HDL (*high density lipoprotein*) gebunden über die Pfortader der Leber zugeführt. Die Hepatozyten

nehmen die Gallensäuren über Na-abhängige (Ntcp, *Na-taurocholat-cotransporting protein*) und –unabhängige (OATP, *organic anion transporting polypeptide*) Transportsysteme an der sinusoidalen Membran auf.

Die hydrophoben und sehr toxischen sekundären Gallensäuren Lithocholat und 7-Keto-Lithocholat werden metabolisiert. Lithocholat wird vor allem sulfatiert. Dies macht die Gallensäure hydrophiler und verhindert jede weitere Resorption, so dass sie ausgeschieden wird. 7-Keto-Lithocholat wird an C₇ hydroxyliert, so dass eine 7-β-Gallensäure, die Ursodeoxycholsäure (UDCA), entsteht. UDCA weist choleretische Wirkung auf und wird zur Therapie von cholestatischen Lebererkrankungen eingesetzt.

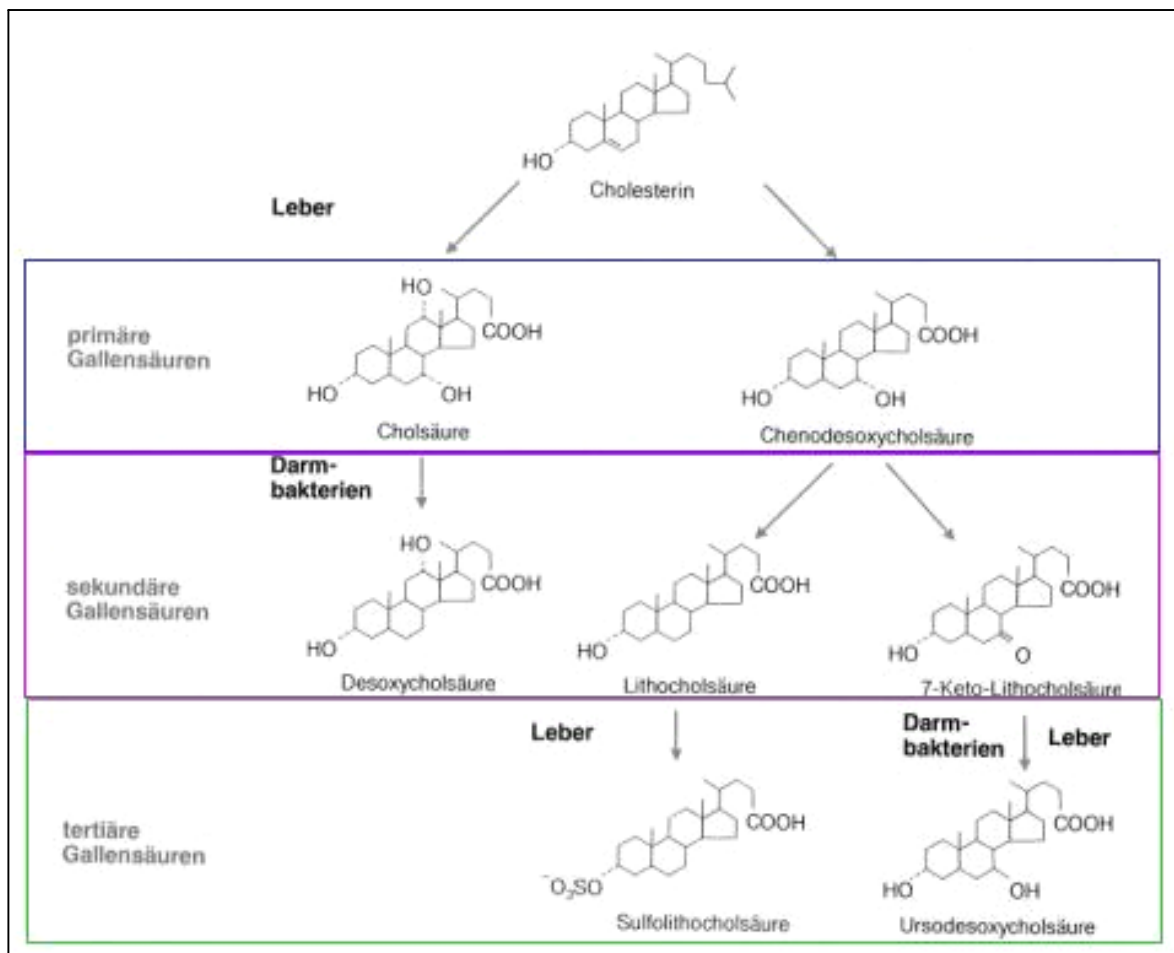


Abbildung 5: Biosynthese der Gallensäuren (aus [62]).

Der menschliche Körper synthetisiert etwa 0,5 g Gallensäuren pro Tag aus Cholesterin, um den Verlust durch Exkretion von etwa 0,5 g auszugleichen.

Insgesamt befinden sich 2 – 5 g Gallensäuren im Körper, die zwischen 3 und 10 mal pro Tag zwischen Leber und Darm zirkulieren. Die Galle dient der Elimination von Cholesterin, der Regulation der Biosynthese von Cholesterin und Gallensäuren und der Verdauung und Resorption von Fetten und fettlöslichen Vitaminen im Darm. Der Gallenfluss resultiert aus der osmotischen H₂O-Bewegung, die vor allem durch die Gegenkationen der Gallensäuren und HCO₃⁻ verursacht wird.

1.5.3. Hepatobiliäre Transportmechanismen

Die Hepatozyten werden über die Leberfortader (*Vena portalis*) und die Leberarterie (*Arteria hepatica*) mit nährstoffreichem und sauerstoffreichem Blut versorgt. Das Blut strömt von den Portalfeldern über die Sinusoide zur terminalen Zentralvene (*Vena centralis*). Die Hepatozyten nehmen unter physiologischen Bedingungen die gallenpflichtigen Substanzen, wie Gallensäuren und Bilirubin, an der sinusoidalen (basolateralen) Membran über spezielle Transportersysteme auf. Die Gallensäuren werden vor allem über den Ntcp-Transporter (*Na-taurocholate cotransporting protein*) im Symport mit Na⁺ aufgenommen. Der benötigte elektrochemische Gradient wird von der Na/K-ATPase aufgebaut. OATP (*organic anion transporting polypeptid*) transportiert Na-unabhängig sowohl Gallensäuren als auch andere organische Anionen wie Medikamente in die Zelle [106]. Cytosolisch sind die Gallensäuren an die Transporterproteine Y-Protein oder H-FABP (*heart fatty acid binding protein*) gebunden. Damit wird ihre Detergenzwirkung vermindert und verhindert, dass sie wieder ins Blut zurück diffundieren. Die Transportproteine sorgen außerdem für den gerichteten Transport zur Modifikation an den Organellen und zur Sekretion an der kanalikulären (apikalen) Membran. Die Ausscheidung der Gallensäuren erfolgt durch mehrere Na-unabhängige, aber ATP-abhängige Transportersysteme gegen einen hohen Konzentrationsgradienten (siehe Abbildung 6). Monovalente Gallensäuren werden über Bsep (*bile salt export pump*) in die Gallenkanalikuli transportiert, divalente vor allem zusammen mit anderen organischen Anionen über Mrp2 (= cMOAT, *multidrug resistance-associated protein 2*). MDR3 (*multidrug resistance protein 3*) des Menschen bzw. dessen Homologes Mdr2 in Ratte und Maus transportieren Phospholipide in die Gallenkanalikuli. Die Phospholipide unterstützen die Mizellenbildung der Gallensäuren. Zusätzlich zu den apikalen Gallensäurenexportsystemen weisen die Hepatozyten auch basolaterale auf, die

einen alternativen Weg zur Gallensäurenexkretion darstellen. Beispiele für basolaterale Transporter sind Mrp1 und Mrp3 (*multidrug resistance-associated protein 1/3*) [213].

Die cholestatische Leberzelle schützt sich vor der Akkumulation der Gallensäuren durch Veränderung der Expression und des Einbaus der Transportsysteme in die basolateralen und apikalen Membranen (siehe Abbildung 6). Der basolaterale Gallensäurenimporter Ntcp wird herunterreguliert, damit nimmt die sinusoidale Gallensäureaufnahme ab [22, 61, 68]. Der dominante apikale Gallensäurenexporter Bsep bleibt unverändert, so dass die Gallensäuresekretion in die Galle weiterhin erhalten bleibt. Die Insertion von Mrp2 in die apikale Membran wird vermindert, der Einbau von Mrp1 und Mrp3 wird hochreguliert. Folglich werden divalente Gallensäuren während Cholestase vermehrt basolateral ausgeschieden [102, 147, 212].

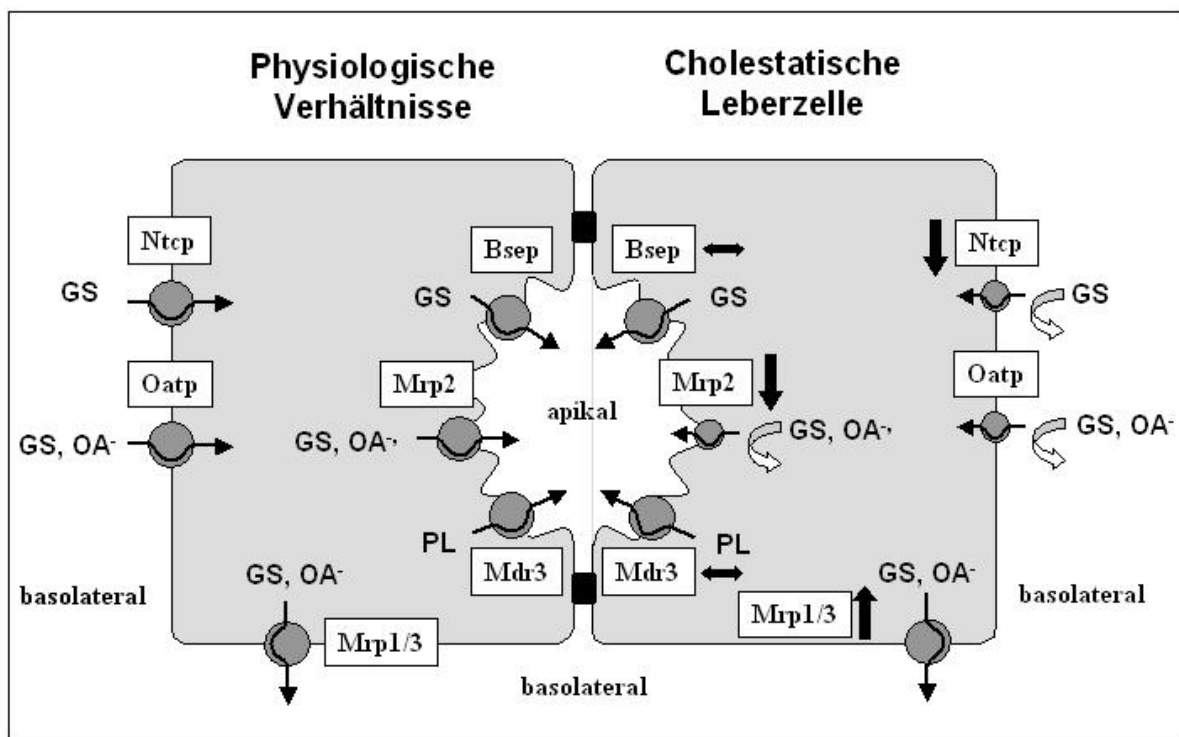


Abbildung 6: Hepatobiliäre Transportmechanismen - Vergleich zwischen physiologischem und cholestatischem Hepatozyt (aus Dissertation K. Bachmüller, Med. II, Klinikum Großhadern, LMU München).

1.5.4. Apoptose und Cholestase

Bei der Cholestase ist die Gallensekretion gestört, so dass es zur Akkumulation von Gallensäuren im Blut und der Leber, vor allem in den Hepatozyten, kommt. Die erhöhte Konzentration von hydrophoben und potentiell toxischen Gallensäuren scheint zur Schädigung und zum Tod der Zellen zu führen. Die Konzentrationen der hydrophoben Gallensäuren Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure korrelieren mit dem Grad der Leberzellschädigung [181]. Im Tiermodell rufen hydrophobe Gallensäuren hepatozelluläre Cholestase und Leberzellschädigung hervor [90, 100]. *In vitro* induzieren Gallensäuren bei Konzentrationen bis 200 μM , denen die Hepatozyten durchaus *in vivo* während der Cholestase ausgesetzt sein können, Apoptose. Bei Konzentrationen über 200 μM induzieren die Gallensäuren Apoptose und Nekrose [183]. Bei PBC-Patienten, gallengangsligierten Ratten und mit Gallensäuren gefütterten Mäusen konnte hepatozelluläre Apoptose nachgewiesen werden [52, 101, 137, 183]. Des Weiteren zeigten Versuche an primären Maushepatozyten und gallengangsligierten Mäusen, dass Bid-antisense Oligonukleotide die Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA)-vermittelte Apoptose und cholestatische Leberschädigung abschwächen können [80]. Ein weiterer Hinweis auf Gallensäuren-induzierte Apoptose ist die reduzierte Zellschädigung und Fibrose durch den Pancaspasen Inhibitor IDN-6556 bei gallengangsligierten Mäusen [26]. Cholestase und Apoptose scheinen eng miteinander verknüpft zu sein.

1.5.5. Adaption der Apoptose in Leberzellen bei chronischer Cholestase

In vitro induzieren hydrophobe Gallensäuren, wie GCDCA oder TLCA, sehr effizient und schnell Apoptose; nach etwa 2 bis 4h wird konzentrationsabhängig Apoptose in den Zellen ausgelöst. Während der Cholestase *in vivo* kommen durchaus Gallensäurenkonzentrationen im Serum vor, die die letale Dosis *in vitro* übersteigen. Trotzdem findet man *in vivo* keine ausgeprägte Apoptose.

Warum induziert die gleiche Gallensäure *in vitro* massive Apoptose, während sie *in vivo* nur geringe Schädigung verursacht? Man geht davon aus, dass die Hepatozyten zu Beginn der Cholestase sehr schnell Schutzmechanismen gegenüber erhöhten

Gallensäurenkonzentrationen entwickeln. Versuche an gallengangsligierten Ratten zeigten, dass in den ersten Tagen nach der Ligation Apoptose, d.h. Fragmentierung der DNA und Caspaseaktivierung, detektierbar waren. Nach wenigen Tagen nahm die Apoptoserate ab. Nach 2 Wochen konnte keine Apoptose mehr nachgewiesen werden. Genauere Untersuchungen offenbarten, dass die beiden antiapoptotischen Proteine cIAP2 und A1 verstärkt exprimiert wurden. cIAP2 ist ein Inhibitor der Caspasen (IAP); A1 ein antiapoptotisches Bcl-2 Protein. Die Hochregulation der Proteine wurde durch Cytokine, die während der Cholestase verstärkt in der Leber vorkommen, über Aktivierung von NF- κ B stimuliert. Inkubation von Hepatozyten *in vitro* mit Cytokinen zeigten eine geringere GCDCA-induzierte Apoptoserate [183]. Bei Untersuchungen von Lebergewebe aus PBC-Patienten wurde beobachtet, dass Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen das antiapoptotische Protein Bcl-2 stärker exprimieren als Zellen aus Gesunden. Die Hepatozyten aus Kontrollpersonen wiesen keine Expression von Bcl-2 auf [101]. Gallengangsligierte Ratten zeigten nach 3 Tagen ebenfalls verstärkte Expression von Bcl-2 [108]. Diese Untersuchungen belegen, dass Zellen Schutzmechanismen gegen die Apoptoseinduktion durch toxische Gallensäuren während der Cholestase aufbauen können und erklären den unterschiedlichen Effekt der Gallensäuren *in vivo* und *in vitro*.

1.5.6. Wirkung der Gallensäuren auf Induktion von Apoptose und Überlebenswegen in der Leberzelle

Die Wirkung der Gallensäuren auf die Hepatozyten hängt im Wesentlichen von der Struktur der Gallensäure, deren Konzentration und dem Verhältnis von hydrophoben und hydrophilen Gallensäuren ab.

GCDCA ist beim Menschen die quantitativ bedeutendste hydrophobe Dihydroxygallensäure und wird für die Gallensäuren-induzierte Leberschädigung bei der Cholestase hauptverantwortlich gemacht. GCDCA löst *in vitro* sehr effizient Apoptose aus, wobei der Mechanismus der Auslösung noch stark diskutiert wird.

Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) induziert *in vitro* kaum Apoptose. Versuche zeigten, dass TCDCA nicht nur Apoptose, sondern auch gleichzeitig Überlebenssignalwege über Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und NF- κ B

aktiviert. Inhibition dieser Überlebenswege steigert die Apoptoseinduktion der TCDCA auf vergleichbare Werte mit der GCDCA [170, 172].

Die hydrophile Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) aktiviert Überlebenssignalwege und verhindert die durch hydrophobe Gallensäuren induzierte Apoptose. Bei gleichzeitiger Inhibition der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) verursacht auch UDCA Apoptose. Ihre protektive Wirkung gegenüber Apoptoseinduktion scheint folglich auf der Aktivierung eines starken MAPK-abhängigen Überlebensweges zu beruhen [159].

1.5.6.1. Gallensäuren-abhängige Apoptose in der Leberzelle

Hepatozyten exprimieren viele Todesrezeptoren, vor allem Fas, TNF- α -Rezeptor-1, TRAIL-Rezeptor-1 und -2. Gallensäuren aktivieren Fas und TRAIL-R2; zeigen aber keine Aktivierung von TNF- α -Rezeptor-1 und TRAIL-Rezeptor-1 [82]. Die starke Expression der Todesfaktoren könnte durch den evolutionären Druck der Beseitigung von infizierten Zellen durch cytotoxische T-Zellen entstanden sein. Oral aufgenommene Krankheitserreger, wie etwa Viren, gelangen über den Darm und das Pfortaderblut direkt in die Leber. Die Leberzellen sind oft die ersten Zellen, die von diesen Krankheitserregern infiziert und vom Immunsystem beseitigt werden.

Obwohl zahlreiche Todesrezeptoren vorhanden sind, zählt man die Hepatozyten zu Typ II-Zellen, d.h. die Apoptose wird immer über den intrinsischen, mitochondrialen Weg verstärkt. Ohne Mitochondrienbeteiligung findet keine Apoptose statt. Bei Auslösung der Apoptose über die Todesrezeptoren werden die Mitochondrien zerstört, so dass proapoptotische Faktoren aus dem Intermembranraum austreten. Die Kopplung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges erfolgt vor allem über Bcl-2-Proteine, wie Bid. Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-X_L kann die Fas-vermittelte Apoptose inhibieren. Bei Typ I-Zellen wird die extrinsisch ausgelöste Apoptose ohne Beteiligung der Mitochondrien ausgelöst. Sie kann allerdings über die Mitochondrien zusätzlich verstärkt werden. Die Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen blockiert die Apoptose nach Auslösung über Fas nicht [1].

Der molekulare Mechanismus der Apoptoseinduktion durch hydrophobe Gallensäuren ist noch nicht vollständig aufgeklärt und wird noch stark diskutiert. Der Großteil der Wissenschaftler geht von einer Fas-vermittelten Apoptoseinduktion unabhängig von der Präsenz des Fas-Liganden aus [52], wobei Gores auch die Aktivierung von TRAIL-R2 durch GCDCA postuliert [79, 81]. Die Oligomerisierung mehrerer Todesrezeptormoleküle aktiviert diese und löst die Ausbildung des DISC-Komplexes mit Aktivierung der Caspase-8 aus. Aktive Caspase-8 proteolytisch spaltet Caspase-3 und -7, sowie Bid, so dass es zur Permeabilisierung der Mitochondrien und Auslösung der Apoptose kommt. Für die Aktivierung des Todesrezeptors existieren verschiedene Modelle. Graf et al. und Sodemann et al. zeigten an primären Rattenhepatozyten, perfundierten Rattenlebern, gallengangligierten Ratten und McNtcp.24-Zellen, dass sowohl GCDCA als auch das Konjugat einer anderen hydrophoben Gallensäure, Tauroolithocholsäure-3-Sulfat, einen verstärkten Transport von Fas-Rezeptoren in Vesikeln zur Plasmamembran induziert. Dies erhöht die Konzentration des Fas-Rezeptors in der Membran und begünstigt die Oligomerisierung, und damit die Aktivierung. Der Transport der Fas-Vesikel scheint von der cJun-N-terminalen Kinase (JNK) reguliert zu werden [191, 66]. Andere Arbeitsgruppen zeigten an primären Rattenhepatozyten, dass GCDCA und Tauroolithocholsäure-3-Sulfat durch Induktion von oxidativem Stress den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) aktivieren, der zum einen die cJun-N-terminale Kinase (JNK) aktiviert und zum anderen an den Fas-Rezeptor bindet. Die Assoziation mit dem Fas-Rezeptor initiiert dessen Tyrosinphosphorylierung, die wiederum den Transport von Fas an die Membran und die Ausbildung des DISC-Komplexes auslöst [157, 164]. Darüber hinaus zeigte Higuchi et al., dass GCDCA die Phosphorylierung von cFLIP, dem Inhibitor der Caspase-8 Aktivierung am DISC-Komplex, stimuliert. Nach der Phosphorylierung kann cFLIP nicht mehr an FADD und den DISC-Komplex binden. Dies erleichtert die Aktivierung der Procaspase-8 [81].

Neben der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose gibt es auch Hypothesen, die postulieren, dass hydrophobe Gallensäuren, wie GCDCA, Rezeptor-unabhängig Apoptose auslösen können. Versuche an isolierten Mitochondrien bewiesen die Fähigkeit der hydrophoben Gallensäuren direkt mit der Mitochondrienmembran zu interagieren und diese zu verändern. GCDCA und DCA modifizieren die Proteinanordnung, den Redox-Status, die Lipidpolarität und -fluidität. Die

hydrophoben Gallensäuren induzierten den Austritt von proapoptotischem Cytochrom c und induzierten eine oxidative Schädigung [194, 103]. Ein weiteres Konzept der Rezeptor-unabhängigen Apoptose besagt, dass die Gallensäuren nach der Aufnahme oxidativen Stress mit Generierung von reaktiven Sauerstoffintermediaten induzieren und dass diese die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran auslösen [192, 193, 229].

1.5.6.2. Gallensäuren-abhängige Überlebenswege in der Leberzelle

Manche Gallensäuren, wie z.B. TCDCA und UDCA, aktivieren Überlebenssignalwege, die die Apoptoseinduktion unterdrücken. Abhängig von der Gallensäure werden unter anderem PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase), NF- κ B und MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) aktiviert. Welche Signalwege zusätzlich involviert sind und wie sie sich gegenseitig aktivieren oder inhibieren, ist noch nicht geklärt [170, 172, 159].

PI3-Kinasen werden durch Tyrosinkinasen und G-Protein-Rezeptoren aktiviert und regulieren Wachstums-, Proliferations-, Migrations und Überlebensprozesse [209]. Sie katalysieren die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃). PIP₃ aktiviert verschiedene Signalmediatoren, wie z.B. die Proteinkinase Akt, auch Protein Kinase B (PKB) genannt, oder PDK 1 (*phosphatidylinositol-dependent kinase 1*) [27, 57, 113]. Wie PI3-Kinasen die Apoptoseinduktion nach unterschiedlichsten Stimuli verhindern, wurde noch nicht entschlüsselt. PI3-Kinasen scheinen die Inaktivierung der proapoptotischen Proteine Bad und Caspase-9 durch Phosphorylierung bzw. die Aktivierung von NF- κ B zu vermitteln [12, 28, 40]. Außerdem wird die Hemmung des proapoptotischen cJun-N-terminalen Kinase-Signaltransduktionsweges (JNK) und die Steigerung der Expression antiapoptotischer Proteine, wie c-Flip, als weitere Reaktionen von PI3-Kinasen postuliert [99, 149]. In Hepatozyten modulieren PI3-Kinasen den intrazellulären Vesikeltransport und damit den Einbau von Transportproteinen in die Plasmamembran [134]. Überdies scheinen sowohl TCDCA als auch Taurocholsäure (TCA) ihre choleretischen Effekte über PI3-Kinasen zu

vermitteln, wohingegen die hydrophobe Tauroolithocholsäure (TLCA) wahrscheinlich über die PI3-Kinasen cholestatisch wirkt [13, 14, 146].

NF-kappa B ist ein Transkriptionsfaktor, der im immunologischen Zusammenhang bekannt geworden ist, heute aber als einer der wichtigsten Regulatoren vielfältiger zellulärer Prozesse, auch der Apoptose, gilt [63, 8, 11]. NF-κB besteht aus Dimeren von RelA (p65) mit NF-κB1 bzw. mit NF-κB2, die im nicht aktiven Zustand im Cytosol an den Inhibitor IκB gebunden sind. Die Aktivierung von NF-κB erfolgt nach entsprechendem Stimulus durch Anlagerung der Adapterproteine TRADD, TRAF2 und RIP an den TNF-α-Rezeptor. An diese Moleküle lagert sich JNK oder NIK (*NF-κB-inducing kinase*) an. JNK vermittelt vor allem proapoptotische Prozesse [95]. NIK aktiviert dagegen IκB-Kinasen, die IκB phosphorylieren und damit inaktivieren. Folglich wird der NF-κB Komplex aktiv, transloziert in den Nukleus und initiiert die Transkription von Genen, die NF-κB-Bindestellen im Promotor aufweisen [141, 231]. Potentielle Zielgene sind unter anderem sowohl Cytokine, Cytokinrezeptoren, Wachstumsregulatoren als auch antiapoptotisch wirkende Gene wie cIAP-1 und -2, Bcl-2, A1 oder Bcl-X_L [65, 184]. Die Aktivierung von NF-κB zeigt vor allem antiapoptotische Effekte und fördert das Überleben nach Apoptosestimulus, wie z.B. TNF-α-Aktivierung [214]. TDCA (Taurodeoxycholsäure) stimuliert beispielsweise in intestinalen Epithelzellen über die Aktivierung von NF-κB die Proliferation und schützt diese Zellen vor TNF-α-induzierter Apoptose [210].

Die Proteine der MAPK-Familie modulieren Genexpression, Mitose, Proliferation, Metabolismus und Apoptose [221]. Die MAPK-Familie besteht aus drei Subfamilien: ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*cJun N-terminal kinase*) und p38-MAPK. Jede dieser Subfamilien beinhaltet mehrere Mitglieder. MAP-Kinasen sind Serin-/Threoninkinasen, die für Signaltransduktion von der Zellmembran in den Kern verantwortlich sind. Die Phosphorylierung ihrer Substrate aktiviert oder inaktiviert diese, abhängig vom Substrat. Die Aktivierung der MAPK erfolgt durch Phosphorylierung von *upstream* gelegenen Kinasen, den MKKs (*mitogen-activated protein kinase kinase*). Die Regulation der Apoptose- bzw. Überlebenssignalwege durch die MAPK ist sehr komplex und noch nicht vollständig entschlüsselt. Vereinfacht kann gesagt werden, dass die ERKs vor allem in Überlebenssignalwege, die JNKs und die p38-MAPK hauptsächlich in die Vorgänge der Apoptose involviert

sind [221]. Inhibierung von ERK 1/2 (p42/44 MAPK) bzw. Stimulierung von p38 MAPK oder JNK 1/2 verstärkt die Gallensäuren-induzierte Apoptose [157, 158].

1.5.6.3. Zusammenfassung der Wirkung der Gallensäuren auf die Leberzelle

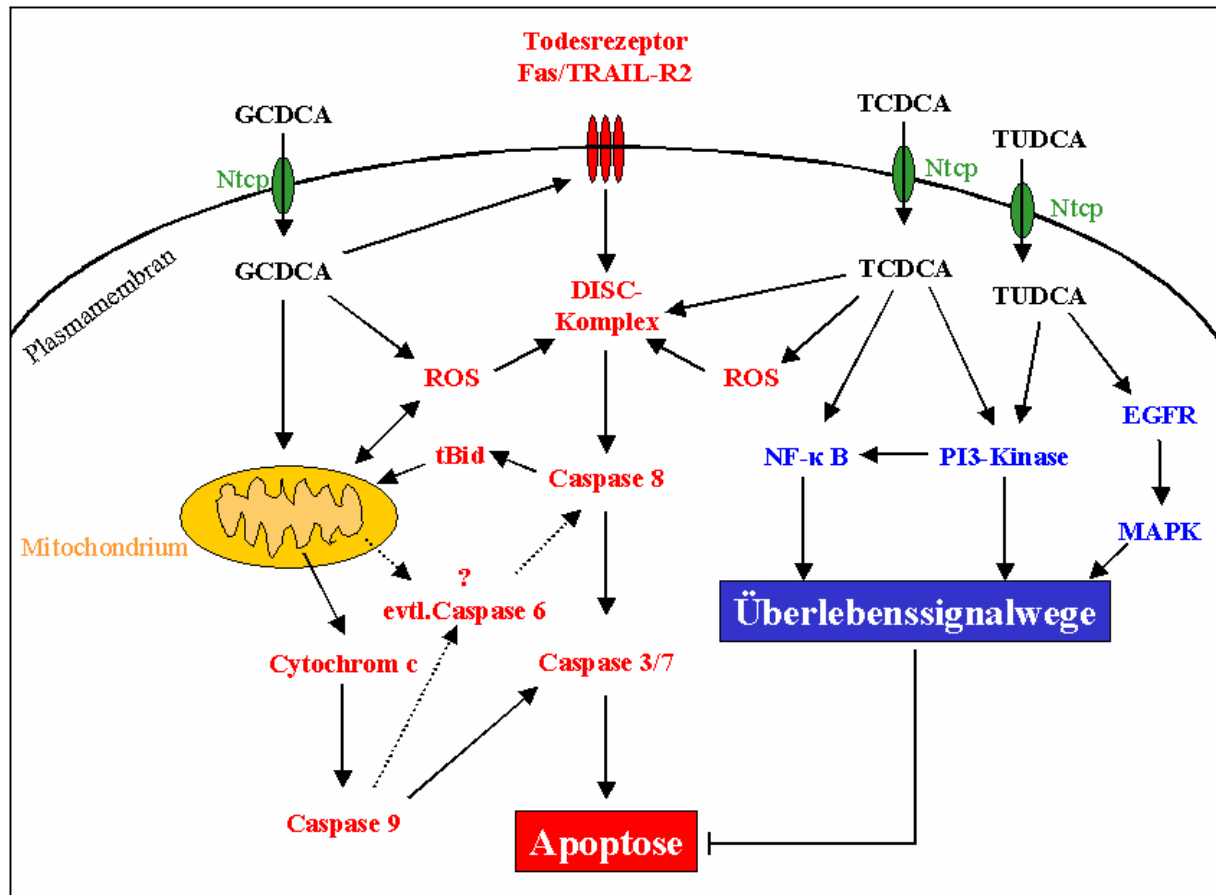


Abbildung 7: Modell des Einflusses der Gallensäuren auf die Leberzelle. Die Gallensäuren werden über den Natrium-Symporter Ntcp in die Zelle aufgenommen. TUDCA und TCDCA (rechts) aktivieren über PI3-Kinase, NF-κB und MAPK Überlebenswege (blau), die die Apoptoseinduktion verhindern. GCDCA (links) induziert keine Überlebenswege; es kommt zur Apoptoseinduktion (rot). Der Mechanismus der Apoptoseinduktion ist noch nicht vollständig geklärt, er erfolgt über Ausbildung des DISC-Komplexes an den Todesrezeptoren mit Aktivierung der Caspase-8 und tBid oder direkt über Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Ob die Generierung der ROS (*reactive oxygen species*) durch die Gallensäuren erfolgt und zur Zerstörung der Mitochondrienmembran bzw. Ausbildung des DISC-Komplexes führt oder ob es eine Konsequenz der Mitochondriendegeneration ist, muss noch aufgeklärt werden. Inwiefern Caspase-8 über den mitochondrialen Reaktionsweg unabhängig vom DISC-Komplex aktiviert werden kann, ist noch nicht entschlüsselt (gestrichelte Pfeile). Unklar ist ebenfalls welches Protein diese Reaktion vermittelt (? in Abbildung 7); ein potentieller Kandidat ist die Caspase-6.

1.6. Sulfasalazin und Curcumin als Modulatoren intrazellulärer Signalwege

1.6.1. Sulfasalazin

Sulfasalazin oder Salazosulfapyridin entstand aus der Verknüpfung des Sulfonamids Sulfapyridin (SPD) mit dem Salizylat 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) unter Bildung einer Azogruppe (siehe Abbildung 8). SPD ist ein Antibiotikum; 5-ASA besitzt anti-inflammatorische Wirkung. Seit 1941 wird Sulfasalazin als Therapeutikum bei rheumatoiden Arthritis eingesetzt [203], später fand es auch in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen Anwendung.

Die Wirkungsmechanismen von Sulfasalazin sind noch weitgehend ungeklärt [58]. Sulfasalazin scheint allerdings Mechanismen zu modulieren, auf die die Einzelbestandteile SPD und 5-ASA keinen Einfluss haben. Salizylaten, wie Sulfasalazin, wird eine Inhibierung von Cyclooxygenasen und der Prostaglandinsynthese zugeschrieben. Ein weiterer Effekt könnte die Modulation von Apoptose- und Überlebens-Signaltransduktionswegen sein. Sulfasalazin wirkt in mikro- und millimolarer Konzentration als Inhibitor des NF- κ B-Transkriptionsfaktors in Kolonzellen [222]. In Lymphozyten zeigt Sulfasalazin in höheren Konzentrationen sowohl die Inhibierung von NF- κ B als auch eine Apoptoseinduktion [118, 119]. Sulfasalazin bedingt eine Akkumulation von Bax an den Mitochondrien und den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, so dass proapoptotische Faktoren, wie Cytochrom c oder AIF austreten und Apoptose auslösen. Der Pancaspasen-Inhibitor Z-VAD-FMK konnte den Untergang der Zellen allerdings nicht verhindern. Somit scheint ein Caspase-unabhängiger Mechanismus entscheidend zu sein. Es wurde gezeigt, dass AIF in den Zellkern transloziert und die Apoptose durch Fragmentierung der DNA auslösen kann. Diese Vorgänge konnten durch Überexpression von Bcl-2 vollständig verhindert werden [119]. Im Gegensatz zu Lymphozyten und Kolonepithelzellen sind die Effekte von Sulfasalazin auf die apoptotischen Signalprozesse in Leberzellen noch völlig unbekannt.

Sulfasalazin wird als magensaftresistente Filmtablette verabreicht, die den Wirkstoff erst im oberen Dünndarmabschnitt freigibt. Ungefähr 30 % des eingenommenen

Sulfasalazins werden im Jejunum absorbiert und gelangen nach enterohepatischer Zirkulation wieder nahezu unverändert in den oberen Dünndarm. Im Dickdarm wird Sulfasalazin durch die Azoreduktasen coliformer Bakterien in seine Einzelkomponenten 5-ASA und SPD gespalten [85].

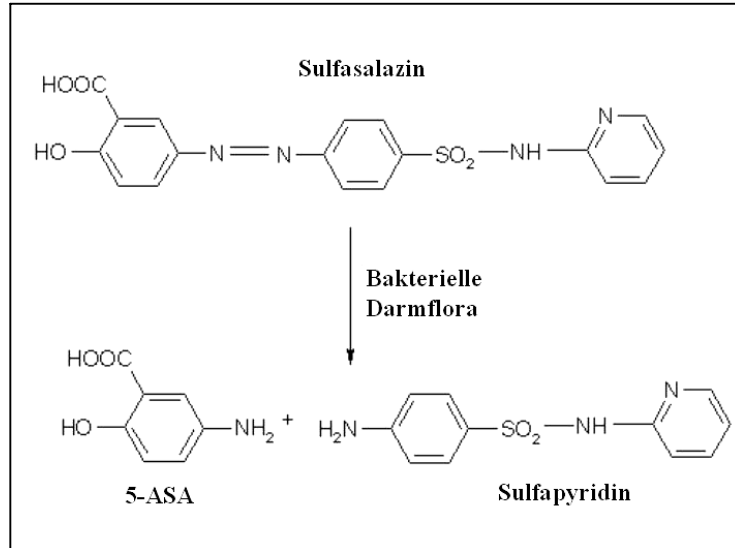


Abbildung 8: Sulfasalazin (SSZ). Strukturformel und Abbau im Kolon durch Darmbakterien in die Bestandteile 5-ASA (5-Aminosalicylsäure) und SPD (Sulfapyridin).

Nach oraler Einnahme variiert der Anteil des Gesamtmoleküls, der die systemische Zirkulation erreicht, zwischen 2% und 10% [151, 186]. Es scheint in dieser Hinsicht keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Probanden oder Patienten zu geben [38, 39, 98, 185]. Nach Gabe einer täglichen Dosis von 4 g reichten die *steady-state*-Serumkonzentrationen von Sulfasalazin bei gesunden Probanden von 4,7 bis 45 µg/ml [186]. Wegen der enterohepatischen Zirkulation von Sulfasalazin finden sich biliäre Konzentrationen, die den Serumspiegel um das 3- bis 10-fache übersteigen [98, 186]. Die Ausscheidung von Sulfasalazin erfolgt größtenteils über die Niere und nur Spuren der Substanz sind im Stuhl nachweisbar [39, 151, 186].

Sulfapyridin wird nach der Spaltung von Sulfasalazin nahezu komplett absorbiert und erfährt in der Leber eine Hydroxylierung, Glucuronisierung und N-Acetylierung. Danach werden die entsprechenden Derivate gemeinsam mit einem geringen Rest nicht modifizierten Sulfapyridins renal eliminiert [56, 185]. Der zweite Bestandteil 5-ASA wird fast vollständig acetyliert. Ungefähr ein Drittel der 5-Aminosalicylsäure findet sich im Urin wieder. Mindestens 50 % werden mit den Faeces ausgeschieden [151].

1.6.2. Curcumin

Curcumin ist ein Derivat aus dem Rhizom von *Curcuma longa* aus der Familie der Zingiberaceae. Curcuma findet weite Verwendung als Gewürz und gelbfärbendes Pigment, wie zum Beispiel in Curry, Senf oder Kartoffelchips. 1815 beschrieben Vogel und Pellatier die Struktur von Curcumin das erste Mal [218]. Fast 100 Jahre später konnte es synthetisch hergestellt werden [112].

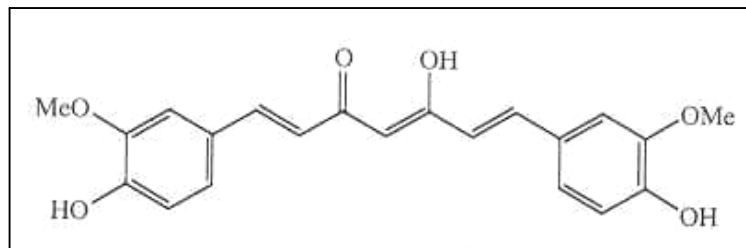


Abbildung 9: Strukturformel von Curcumin.

Curcumin wird bei der Therapie der unterschiedlichsten Erkrankungen, wie etwa Malaria oder Alzheimer, ausgetestet und als chemopräventative Substanz in einigen Studien eingesetzt. Zunehmend wird der Einsatz von Curcumin für die Behandlung von Tumorerkrankungen untersucht. Der Extrakt aus *Curcuma longa* bewirkt in Nagern die Suppression, Retardation und Inversion der Karzinogenese [48]. Curcumin weist außerdem anti-oxidative und anti-inflammatorische Wirkung auf [87, 88, 199]. Eine anti-metastatische Aktivität von Curcumin konnte ebenfalls nachgewiesen werden [131].

In vitro blockiert Curcumin in verschiedenen Zelltypen, wie Thymozyten, Osteoclasten und Endothelzellen, die Proliferation [6]. In verschiedenen Tumorzelllinien, wie B- und T- Lymphomen, Kolonkarzinomen oder Brustkarzinomen, zeigt Curcumin sogar eine Apoptose-induzierende Wirkung [31, 107, 160]. Andere Zellen hingegen reagierten nicht nach Curcumin-Stimulation. Curcumin scheint die Fähigkeit zu besitzen, in Tumorzellen Apoptose zu induzieren, während es keine cytotoxischen Effekte auf gesunde Zellen aufweist.

Trotz zahlreicher experimenteller Ansätze konnte keine der vielfältigen Wirkungen von Curcumin auf molekularer Ebene eindeutig entschlüsselt werden. Viele publizierte Beobachtungen weisen auf eine Modulation zellulärer Signalwege mit

Reduzierung der AP-1 (*activation protein 1*) Aktivität hin. Curcumin induziert die Inhibition des AP-1 Transkriptionsfaktors und die Modulation der AP-1-Dimer Komposition [44]. Es kann den Signaltransduktionweg, der zur JNK-Aktivierung (*c-Jun N-terminal kinase*) führt, bereits auf der Ebene der MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) inhibieren und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors cFos durch Blockade von ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) und JNK verhindern [32, 195]. Des Weiteren inhibiert es die NF-κB-Aktivierung, diverse Phospholipasen sowie Cyclooxygenase 2 (COX-2) und Lipooxygenase (LOX), die bei Entzündungsreaktionen beteiligt sind [48].

Curcumin ist eine nichttoxische Substanz, die von vielen Kulturen in Dosen von etwa 100 mg/Tag über Jahrhunderte mit dem Essen aufgenommen wurde [5]. Wegen der polyphenolischen Struktur ist es sehr lipophil und kann Zellmembranen leicht passieren.

Eine Studie der Klinischen Phase I zeigte, dass eine tägliche Dosis von 8 g Curcumin über einen Zeitraum von 3 Monaten keine toxischen Nebenwirkungen hervorruft. Etwa 1-2 h nach oraler Aufnahme waren die Serumspiegel maximal und sanken in den folgenden 12 h kontinuierlich. Die durchschnittlichen Serumkonzentrationen lagen bei einer Aufnahme von 4 g, 6 g, oder 8 g Curcumin bei $0,51 \pm 0,11 \mu\text{M}$; $0,63 \pm 0,06 \mu\text{M}$ bzw. $1,77 \pm 1,87 \mu\text{M}$ [33].

Die Pharmakokinetik wurde in Mäusen durch intraperitoneale Gabe von 0,1 g Curcumin/kg untersucht. Etwa 15 Min nach Applikation stieg die Konzentration im Plasma auf $2,25 \mu\text{g}$ Curcumin pro ml an. Nach 1 h wurden in Darm, Milz, Leber und Nieren $177 \mu\text{g}$, $26 \mu\text{g}$, $27 \mu\text{g}$ und $7,5 \mu\text{g}$ Curcumin pro g Gewebe gefunden. Im Gehirn waren nur sehr geringe Spuren von $0,41 \mu\text{g/g}$ detektierbar [148].

HPLC und Massenspektroskopie zeigen, dass Curcumin zuerst eine Biotransformation zu Dihydrocurcumin und Tetrahydrocurcumin erfährt. Diese Metabolite werden dann allmählich mit Glucuronsäure konjugiert [148]. Die systemische Bioverfügbarkeit von Curcumin ist gering [33]. Glucuronsäure-konjugiertes Curcumin wurde in intestinalen und hepatischen Microsomen gefunden. Curcuminsulphat, Tetrahydrocurcumin und Hexahydrocurcumin konnte zudem im Cytosol von humanen Darm- und Leberzellen nachgewiesen werden [117]. Deshalb könnte die pharmakologische Wirkung, zumindest zum Teil, durch Curcumin-Metabolite vermittelt werden.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von Signalwegen, über die die quantitativ bedeutendste, potentiell toxische humane Gallensäure Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) Apoptose in menschlichen Leberzellen induziert. Hierbei wird insbesondere auf die molekularen Mechanismen der Induktion und die Modulation der Transkription pro- und antiapoptotischer Gene fokussiert. Als Modell dient die stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfizierte humane Hepatomzelllinie HepG2.

Fragestellung 1: Welche Bedeutung kommt dem Fas-Rezeptor und der Caspase-8 bei der GCDCA-induzierten Apoptose in menschlichen Leberzelllinien zu?

Hydrophobe Gallensäuren lösen nach Aufnahme in die Hepatozyten Apoptose aus. Der molekulare Mechanismus der Induktion wird noch kontrovers diskutiert. Zur Klärung der Bedeutung des Fas-Rezeptors für die Gallensäuren-induzierte Apoptose wurden die humanen Fas-defizienten Zelllinien Hep3B und Huh7 im Vergleich zur Fas exprimierenden Zelllinie HepG2 auf Ihre Sensibilität gegenüber der Gallensäuren-vermittelten Apoptose getestet. Die Rolle der Caspase-8 wurde bei der Gallensäuren-induzierten Apoptose über Versuche mit siRNA gegen Caspase-8 und dem spezifischen Caspase-8 Inhibitor Z-IETD-FMK untersucht.

Fragestellung 2: Wie wird die Transkription pro- und antiapoptotischer Gene durch GCDCA in der humanen Zelllinie HepG2 moduliert?

Zuerst wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch dessen Modulator Sulfasalazin bei der Apoptose in Leberzellen überprüft. Anschließend wurde als Expressions-Screen von mehreren hundert Apoptose-spezifischen Genen ein Microarray mit GCDCA in An- und Abwesenheit von mit Sulfasalazin stimulierten und nicht stimulierten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch quantitative RT-PCR verifiziert. In weiterführenden Versuchen wurden die Ergebnisse mittels EMSA und Reportergenassay *in vitro* bestätigt. Zur Überprüfung der Funktion des Gens während der Apoptose wurden Überexpressions- und Inhibitionsexperimente durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Radiochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Feinchemikalien wurden vorwiegend von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), SERVA (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Radiochemikalie ^{32}P -ATP wurde von der Firma Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA) bezogen. Falls Chemikalien anderer Firmen benutzt wurden, wird gesondert darauf hingewiesen.

Das verwendete Wasser wurde über eine Filteranlage der Firma Millipore (Bedford, USA) entionisiert und wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Kunststoffware:

Einmalkunststoffwaren wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Josef Peske (Aindling-Pichl), Sarstedt (Nümbrecht) bezogen; Gewebekulturgefäße von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden); Einmalkanülen von der Firma Sarstedt (Nümbrecht); Einmalhandschuhe von der Firma Semperit (Wien) und Sterilfilter von der Firma Millipore (Bedford, USA).

Transfermembran:

Die verwendete PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße) wurde von der Firma Millipore (Bedford, USA) hergestellt.

Filme:

Es wurden BioMax MR und ML Röntgenfilme der Firma Kodak (Stuttgart), sowie Hyperfilm ECL der Firma Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) eingesetzt.

2.1.3. Plasmide

Plasmide	Eigenschaften
pcDNA3.1	Eukaryontischer Expressionsvektor, CMV-Promoter ermöglicht die Expression rekombinanter DNA in eukaryontischen Zellen (Invitrogen, Heidelberg)
pcDNA3.1-Ntcp	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierende Sequenz für den Gallensäuretransporter Ntcp und die Resistenz gegenüber Geneticin (G418)
GFP	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierende Sequenz für GFP (Gibco Life Technologies)
pSUPER	Eukaryontischer Vektor für RNAi mit H1-RNA-Promotor, basiert auf pBlueSkript-KS (Stratagene), [24]
pSUPER-Caspase-8	pSUPER mit RNAi-Sequenz gegen Caspase-8 (C. Bernt)
pSUPER-Caspase-8-Puromycin	pcDNA 3.1 Plasmid mit siRNA Kasette (bestehend aus H1-Promoter und Caspase-8-Sequenz) und Resistenzgen gegen Puromycin
pSUPER-PKC-alpha Konstrukt A	pSUPER mit RNAi-Sequenz gegen Proteinkinase C alpha (C. Bernt)
pSUPER-PKC-alpha Konstrukt B	pSUPER mit RNAi-Sequenz gegen Proteinkinase C alpha (C. Bernt)
pGL3-Promotor	Luciferase-Reporter gen Vektor mit eukaryontischem SV40 Promotor und <i>Firefly</i> -Luciferase Gen (Promega, Madison, USA)
pGL3-Promotor-AP1	pGL3-Promotor-Vektor mit 6 x AP1-Bindestellen vor dem Promotor (C. Bernt)
Collagenase-Luciferase	Collagenase-Promotor vor <i>Firefly</i> -Luciferase-Gen, (enthält eine AP-1 Bindestelle) (AG Eichhorst, Med II, Klinikum Großhadern, LMU München)
TK-Renilla	Thymidinkinase-Promotor vor <i>Renilla</i> -Luciferase-Gen (Promega, Madison, USA)
DN FADD	Dominant negative Mutante des FADD-Gens im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (AG Kolligs, Med II, Klinikum Großhadern, LMU München)

DN FADD-GFP	Dominant negative Mutante des FADD-Gens, fusioniert an GFP (Prof. Gores, Mayo Clinic & Foundation Rochester, MN, USA)
Fas-Rezeptor	Eukaryontischer Expressionsvektor pCMV-SPORT6 (Invitrogen), trägt die kodierende Sequenz für den humanen Fas-Rezeptor (RZPD, Heidelberg)
cJun	cJun in pcDNA 3.1 (-) (Dr. Birrer, National Cancer Institute, Rockville, USA)
TAM67	Dominant negative Mutante von cJun in pcDNA 3.1 (-) (Dr. Birrer, National Cancer Institute, Rockville, USA)
cFos	Humanes cFos-Gen in pcDNA3.1 (C. Bernt)
JunB	Humanes JunB-Gen in pcDNA3.1 (C. Bernt)

Tabelle 1: Plasmide

2.1.4. DNA-Oligonukleotide

Alle DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
PKC α -A	1 : GATCCCCAAAGGCTGAGGTTGCTGATTTCAAGAGAATCAGCAA CCTCAGCCTTTTTTTTGGAAA 2 : AGCTTTTCCAAAAAAAAGGCTGAGGTTGCTGATTTCTCTTGAAA CAGCAACCTCAGCCTTTGGG	pSUPER Klonierung (siRNA)
PKC α -B	1 : GATCCCCAACGGGCTTTTCAGATCCTTTTCAAGAGAAAGGATCT AAAGCCCGTTTTTTTGGAAA 2 : AGCTTTTCCAAAAAACGGGCTTTTCAGATCCTTTCTCTTGAAA GGATCTGAAAGCCCGTTGGG	pSUPER Klonierung (siRNA)
Caspase 8	1 : GATCCCCAAGTTCCTGAGCCTGGACTTTTCAAGAGAAGTCCAGG TCAGGAACTTTTTTTTGGAAA 2 : AGCTTTTCCAAAAAAGTTCCTGAGCCTGGACTTCTCTTGAAA TCCAGGCTCAGGAACTTGGG	pSUPER Klonierung (siRNA)
RelB	1 : GTGTGAGGAAGAAGGAGATTGA 2 : GTGGATTTCTTGTCATAGACGG	quantitative RT- PCR
Rox	1 : GGGATCGGAACCAGAGAAGT 2 : CGCAGCACGCTCAGATTGG	quantitative RT- PCR

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
JunB	1 : GCCACCTCCCGTTTACACCA 2 : GGCACGGTCTGCGGTTCCCT	quantitative RT-PCR
cFos	1 : CAGTTATCTCCAGAAGAAGAAGA 2 : CCGCTTGGAGTGTATCAGTCA	quantitative RT-PCR
GAPDH	1 : ACCACAGTCCATGCCATCAC 2 : TCCACCACCCTGTTGCTGTA	quantitative RT-PCR
BIRC2	1 : CGAGAGAACTGATTGATACCAT 2 : TGGCATACTACCAGATGACC	quantitative RT-PCR
Bcl-X _L	1 : GGTAAACTGGGGTCGCATTGT 2 : CTCTCGGCTGCTGCATTGTTC	quantitative RT-PCR
AP1-Luc	1 : CTGAGTCAGCTGACTCATGAGTCAGTGAGTCAGTGACTCACTG ACTCAGGTAC 2 : CTGAGTCAGTGAGTCACTGACTCACTGACTCATGAGTCAGCTG ACTCAGGTAC	Reportergen-Assay
Fas-Rezeptor	1 : AGAGTGTGTGCACAAGGCTG 2 : CACTCTGCAACCTCTCTCCC	PCR

Tabelle 2: Oligonukleotide

2.1.5. Molekulargewicht- und Längenstandards

- Precision Plus Protein Standard (Biorad, München)
- 50 bp DNA-Leiter DNA-Größenstandard (Peqlab, Erlangen)
- DNA Sizer XII, DNA Größenstandard (Peqlab, Erlangen)

2.1.6. Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)

- BioRad Protein Assay (BioRad, München)
- Fugene Transfection Reagent (Roche, Mannheim)
- Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi) (Machery-Nagel, Düren)
- NucleoSpin RNA II (Machery-Nagel, Düren)
- Gel Extraction Kit (Machery-Nagel, Düren)
- SOC-Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- LB Broth Base (Gibco Technologies, Carlsbad, USA)

- QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden)
- Caspase-Glo 9 Assay (Promega, Madison USA)
- Caspase-Glo 8 Assay (Promega, Madison USA)
- Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison USA)
- Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, USA)

2.1.7. Enzyme

Es wurden Enzyme von den Firmen Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller im Protokoll aufgeführten Reaktionsbedingungen gewählt.

2.1.8. Puffer und Lösungen

- Blocklösung (Western Blot) 5% (w/v) Milchpulver in TBST (WB)
oder 5% (w/v) BSA in TBST (WB)

- Blocklösung (Immunocytoologie) 3% BSA in TBST (IC)

- DNA-Auftragspuffer (10x) 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM EDTA
1% SDS (w/v)
30% (w/v) Glycerin
0,1% (w/v) Bromphenolblau

- EMSA-5 x Bindungspuffer 50mM Tris-HCl, pH 7,5
20% Glycerin
5 mM MgCl₂
2,5 mM EDTA
250mM NaCl

-
- EMSA-Ladepuffer
250 mM Tris-HCl, pH 7,5
40% Glycerin
0,2% Bromphenolblau

 - EMSA- 10x TBE
53,9 g Tris-Base
3,72 g Na₂EDTA x 2 H₂O
ad 500ml ddH₂O
pH 8,3 mit Borsäure einstellen (ca. 27,5 g)

 - [H³]-TCA-Aufnahme-Puffer
10 mM Hepes, pH 7,5
100 mM NaCl
2 mM KCl
1 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
5,5 mM D-Glucose

 - [H³]-TCA-Inkubations-Puffer
100 µl [H³]-TCA-Stop-Puffer
10 µl [H³]-Taurocholat (3 Ci/mM)
9,89 ml [H³]-TCA-Aufnahme-Puffer

 - [H³]-TCA-Stop-Puffer
[H³]-TCA-Aufnahme-Puffer mit 1mM TCA

 - Kernextraktionspuffer A
10 mM Hepes, pH 7,9
10 mM M KCl
0,1 mM EDTA
0,1 mM EGTA
1 mM DTT
0,5 mM PMSF

 - Kernextraktionspuffer B
20 mM Hepes, pH 7,9
0,4 M NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
25% Glycerin
-

	1 mM DTT
	1 mM PMSF
▪ Lowry-Lösung A	190 mM Na ₂ CO ₃ 0,1 M NaOH
▪ Lowry-Lösung B1	70 mM KNa-Tartrat
▪ Lowry-Lösung B2	40 mM CuSO ₄
▪ Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1% Triton-X 100 2 mM EDTA Complete 0,1 mM NaVO ₃ 10 mM NaF
▪ PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,6 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,0 –7,5
▪ SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
▪ SDS-Probenpuffer (2x)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 25% (w/v) Glycerin 2% SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 5,3% (v/v) β-Mercaptoethanol

-
- | | |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| ▪ SDS-Sammelgelpuffer (4x) | 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 |
| ▪ SDS-Trenngelpuffer (4x) | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 |
| ▪ Stripping-Puffer | 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7
2% SDS
1% β -Mercaptoethanol |
| ▪ TAE-Puffer (50x) | 2 M Tris-HCl, pH 8,5
5,71% Essigsäure
0,1 M EDTA |
| ▪ TBST (Western Blot) | 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
137 mM NaCl
0,1% Tween 20 |
| ▪ TBST (Immunocytoologie) | 100 mM Tris-Base
150 mM NaCl
0,1% Triton-X 100 |
| ▪ TE | 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA |
| ▪ Transferpuffer | 25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin
10% (v/v) Methanol |
| ▪ TSS | 10% (w/v) Polyethylenglykol 6000
5% (v/v) DMSO
50 mM MgCl ₂ in LB-Medium |

2.1.9. Organismen und Zelllinien

2.1.9.1. Bakterien

E.coli: Stamm DH5 α F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1*
endA1 hsdR17 (*r_K⁻ m_K⁺*) *supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1*

2.1.9.2. Eukaryontische Zelllinien

- HepG2 humane Leberkarzinomzelllinie

- HepG2-Ntcp HepG2, stabil transfiziert mit pcDNA3.1-Ntcp

- Hep3B Fas- und p53-defiziente Leberkarzinomzelllinie

- Hep3B-Ntcp Hep3B, stabil transfiziert mit pcDNA3.1-Ntcp

- Huh7 Fas-defiziente humane Leberkarzinomzelllinie

- Huh7-Ntcp Huh7, stabil transfiziert mit pcDNA3.1-Ntcp

- HeLa humane Gebärmutterkarzinomzelllinie

- Cos Affen Nierenkarzinomzelllinie

- Jurkat humane T-Lymphozytenkarzinomzelllinie

2.1.10. Medien

2.1.10.1. Medien für Bakterien

- LB-Medium: 20 g LB Broth Base (Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA)
pro Liter ddH₂O

Festmedien wurden durch Zugabe von 15 g Agar-Agar (Roth, Karlsruhe) pro Liter LB-Medium hergestellt.

Selektionsmedien enthielten 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 35 µg/ml Chloramphenicol.

2.1.10.2. Medien für eukaryontische Zellkultur

- Earle´s MEM (PAA, Cölbe, Österreich)
- Fötale Kälberserum (FCS)(PAA, Cölbe, Österreich)
- L-Glutamin (100x) (Gibco LifeTechnologies, Karlsruhe)
- Natriumpyruvat (100x) (GibcoLife Technologies, Karlsruhe)
- Antibiotic-Antimycotic-Mix (100x) (GibcoLife Technologies, Karlsruhe)
- Trypsin/EDTA (1x) (PAA, Cölbe, Österreich)
- Geneticin (G418) (Gibco Life Technologies)
- Einfriermedium: 90% FCS
10% DMSO

Die Zelllinien wurden in Earle´s MEM, das 10% fötales Kälberserum, 1x (4 mM) L-Glutamin, 1x (1 mM) Natriumpyruvat, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 0,4 x Antibiotic-Antimycotic-Mix enthielt, kultiviert. Den stabil transfizierten Ntcp-Zellen wurde zusätzlich Geneticin (G418) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml (HepG2 und Huh7 Zellen) bzw. 500 µg/ml (Hep3B Zellen) Medium gegeben.

Primäre Hepatozyten:

- Adhärermedium: William´s E Medium supplimentiert mit
 - 10% FCS
 - 1% Penicillin
 - 90 mg/l Cystein
 - 55 mg/l Methionin
 - 0,01 Units Insulin/ml
 - 10 nM Dexametason

- Kulturmedium: William's E Medium supplementiert mit:
 - 10% FCS
 - 1% Penicillin
 - 90 mg/l Cystein
 - 55 mg/l Methionin

2.1.11. Antikörper

In der nachfolgenden Tabelle sind alle verwendeten Antikörper aufgelistet.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Herkunft	Hersteller
β-Aktin (clone AC-15)	monoklonal	Maus	Sigma
Aktin (I-19)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz
Bcl-X _L	polyklonal	Hase	Cell Signaling
Caspase-3	polyklonal	Hase	Cell Signaling
Caspase-7	monoklonal	Maus	Cell Signaling
Caspase-8 (Ab-4)	polyklonal	Hase	Neomarkers
Caspase-10	polyklonal	Hase	Cell Signaling
c-Fos (4)	polyklonal	Hase	Santa Cruz
c-Fos (Ab-2)	polyklonal	Hase	NeoMarkers
c-Jun	monoklonal	Maus	BD Transduction Laboratories
cleaved Caspase-3	polyklonal	Hase	Cell Signaling
cleaved Caspase-8	monoklonal	Maus	Cell Signaling
cleaved Caspase-8	polyklonal	Maus	AG Eichhorst, Med II Klinikum Großhadern, LMU München
cleaved Caspase-9	polyklonal	Hase	Cell Signaling
Cytochrom c	monoklonal	Maus	BD Transduction Laboratories
FADD (S-18)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz

Fas	monoklonal	Maus	BD Transduction Laboratories
Fas (A-20)	polyklonal	Hase	Santa Cruz
GAPDH	monoklonal	Maus	Abcam (Cambridge, UK)
Jun B (C-11)	monoklonal	Maus	Santa Cruz
NF- κ B p65 (F-6)	monoklonal	Maus	Santa Cruz
Phospho-ERK 1/2	monoklonal	Maus	Cell Signaling
Phospho-JNK	polyklonal	Hase	Cell Signaling
Phospho-p38MAPK	polyklonal	Hase	Cell Signaling
anti-rabbit-HRP		Ziege	Bio-Rad
anti-Ziege-HRP		Esel	Santa Cruz
anti-Maus- HRP		Ziege	Santa Cruz
Texas Red anti-rabbit		Ziege	Vector Laboratories
Fluoresceine anti-mouse		Pferd	Vector Laboratories
Alexa Fluor 488 anti-mouse		Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-rabbit		Ziege	Molecular Probes

Tabelle 3: Antikörper

2.1.12. Sonstige Materialien und Geräte

Neben den bisher genannten Materialien wurden bei den Arbeiten für diese Dissertation noch nachfolgende Utensilien verwendet:

- Brutschränke (Heraeus, Hanau)
- Cytofluor Series 4000 (PerSeptive Biosystems)
- Electrophoresis Power Supply 200/2.0 (Bio-Rad)
- Elektrophorese-/Transferkammern (Bio-Rad)
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135TV mit Axiocam MPm (Zeiss, Oberkochen)
- Flüssigszintillationszähler TRI-CARB 2100 TR (Canberra-Packard, Schwadorf,

Österreich)

- Heizblock (Eppendorf)
- Inkubationsschüttler, Drehrad etc. (electronic, GFL etc.)
- Kühlzentrifuge EBA 12 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Lichtmikroskop IX 50 (Olympus, Oslo, Norwegen)
- Luminometer TD-20/20 (Turner Designs Instruments, Sunnyvale, USA)
- PCR-Cycler Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer)
- Photoentwicklermaschine (Agfa)
- Pipetten (Eppendorf)
- quantitativer PCR-Cycler Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research, Australia)
- Spektrometer U-1100 (Hitachi)
- Sterilbank (Heraeus, Hanau)
- Thermocycler (Biometra)
- Tischzentrifuge 3200 (Eppendorf)
- Ultraschallgerät Sonifier B-12 (Branson Company, Danbury, USA)
- UV Transilluminator (UVP, Upland, USA)
- Wasserbäder (Haake Fisions, GFL, Julabo)
- Whatman-Filterpapier (Whatman)

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Nukleinsäurefällung

Um eine Nukleinsäurefällung durchzuführen, versetzt man eine wässrige DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3M Natriumazetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2-fachen Volumen kalten 100% Ethanol. Dann wird die Lösung mindestens 30 Min bei -80°C gehalten, damit die DNA ausfällt. Anschließend zentrifugiert man bei 4°C mit $20000 \times g$ für 15 Minuten. Die DNA bildet ein durchsichtiges Pellet, das zweimal mit 70% Ethanol gewaschen wird, damit mitgefällte Salze entfernt werden. Danach wird das Pellet an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in ddH₂O gelöst.

2.2.1.2. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt. Dazu werden 100 µl einer DNA-Verdünnung in eine Quarzküvette gegeben und die optische Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Aus der optischen Dichte und dem Verdünnungsfaktor wird die Konzentration durch folgende Formel berechnet (aus [139]):

$$c \text{ [}\mu\text{g}/\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V= Verdünnungsfaktor
F= Multiplikationsfaktor;
für doppelsträngige DNA gleich 50

Es ist darauf zu achten, dass nur eine OD zwischen 0,05 - 1 messbar ist, was einer DNA-Konzentration von 2,5 - 50 µg/ml entspricht.

Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zeigt den Grad der Reinheit der DNA an und liegt bei sehr reiner DNA bei etwa 1,8.

2.2.1.3. Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus 1 - 2 ml Übernachtskulturen wird mit dem „NucleoSpin Plasmid Quick Pure-Kit“ von Machery-Nagel gemäß des mitgelieferten Protokolls durchgeführt.

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA werden die „NucleoBond PC 100- bzw. PC 500-Kits“ der Firma Machery-Nagel benutzt, wobei das Protokoll genau befolgt wird. Ausgangskulturen sind bakterielle Übernachtskulturen mit 100 - 500 ml Volumen, je nach Art des Plasmids.

Diese DNA kann unter anderem zur Transfektion von Gewebekulturzellen oder zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.2.1.4. Isolation von RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolation von Gesamt-RNA wird mit dem „Nucleo Spin RNA II“-Kit der Firma Machery-Nagel durchgeführt. Dafür werden die Zellen 48 h vor der Isolation auf Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät, so dass zum Zeitpunkt der Präparation etwa 5×10^6 Zellen zur Verfügung stehen. Die Gesamt-RNA wird so

schnell wie möglich, in einer weitgehend DNase- und RNase freien Umgebung, gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die eventuell enthaltene DNA wird durch DNase I verdaut. Um eine höhere Konzentration zu erhalten, wird die RNA beim letzten Protokollpunkt in 45 µl DNase-/RNase-freiem H₂O gelöst. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die Gesamt-RNA aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgt unter der vom Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym angegebener Puffer- und BSA-Konzentration. Pro 1 µg DNA werden 2 bis 5 U (Units) Enzym eingesetzt. Um eine unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wird darauf geachtet, dass das Reaktionsvolumen mindestens das 10-fache Volumen des in Glycerin gelösten Enzyms beträgt. Die Restriktionsspaltung inkubiert mindestens 2 h bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1/9 Volumen 10 x DNA-Auftragspuffer beendet. DNA-Doppelspaltungen erfolgen gleichzeitig nach den Angaben des Herstellers oder werden, wenn erforderlich, seriell durchgeführt.

2.2.1.6. Dephosphorylierung mit CIAP

Um die Religation eines geschnittenen Plasmids zu unterdrücken, werden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation dephosphoryliert. Durch Zugabe von 1/9 Volumen 10 x CIAP-Puffer und 1 µl CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) (0.05 - 1 U) (MBI Fermentas) wird das Plasmid 30 Min bei 37°C dephosphoryliert. Danach erfolgt die Inaktivierung der CIAP bei 70°C für 5 Min und 65°C für 1 h.

2.2.1.7. Phosphorylierung von DNA mit PNK

Die Phosphorylierung von doppelsträngiger DNA am 5`-Ende erfolgt durch Inkubation der DNA mit 2 µl 10 x PNK-Puffer, 1 µl Polynukleotidkinase (PNK)(MBI Fermentas) und 2 µl ATP (100 mM) in einem Endvolumen von 20 µl für 30 Min bei 37°C. Im

Anschluss muss die Polynukleotidkinase durch zehninütiges Erhitzen bei 70°C inaktiviert werden.

2.2.1.8. Phosphorylierung und Hybridisierung von 2 komplementären Oligonukleotiden

Bei Klonierungen können zwei komplementäre, synthetisch hergestellte Oligonukleotide nach Phosphorylierung und Hybridisierung als Insert verwendet werden. Die Phosphorylierung erfolgt wie in Kapitel 2.2.1.7. beschrieben zunächst für jedes DNA-Oligonukleotid einzeln. Als nächstes werden die Phosphorylierungsansätze der komplementären Oligonukleotide vereinigt und durch Inkubation für 4 Min bei 90°C, 10 Min bei 70°C und langsames Abkühlen im Wasserbad auf 4°C hybridisiert.

2.2.1.9. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird für die Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Das Agarosegel wird hergestellt, indem man 0,8 bis 2,5 g Agarose in 100 ml TAE durch Aufkochen löst, die flüssige Agaroselösung in eine Gießkammer gibt und einen Kamm zur Bildung der späteren Probenauftragstaschen in die Lösung steckt. Nach dem Festwerden übergießt man das Gel mit TAE-Puffer, zieht den Kamm heraus und trägt die Proben auf, die aus der aufzutrennenden DNA und 1/9 Volumen 10x DNA-Auftragspuffer bestehen. Nach Anlegen einer Spannung von 5V/cm wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Sichtbar gemacht wird die DNA durch Inkubation des Gels für 5 Min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer), anschließender Entfärbung für 5 Min in TAE und Betrachtung unter UV-Licht.

2.2.1.10. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarosegel erfolgt abgewandelt nach Tautz und Renz [206]. Die DNA-Bande wird im UV-Durchlicht (365 nm) aus dem Gel herauspräpariert, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit dem „Nucleo Spin

Extract“-Kit (Machery-Nagel) nach den Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert. Die Elution der DNA erfolgt in 20 - 30 µl ddH₂O.

2.2.1.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase verknüpft die kohäsiven Enden eines DNA-Fragments und eines geschnittenen Plasmids. Es werden 50 bis 100 ng geschnittene Plasmid-DNA mit einem mindestens dreifachen molaren Überschuss des DNA-Fragments, 2 µl 10 x Ligasepuffer, 2,5 U (Units) T4-DNA-Ligase (Biolabs) und ddH₂O in einem Endvolumen von 20 µl 1 - 3 Stunden bei RT oder besser bei 16°C über Nacht inkubiert. 5 µl der Ligationsreaktion werden zur Transformation in Bakterien eingesetzt (siehe 2.2.2.2. Transformation).

2.2.1.12. DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen erfolgen nach der nichtradioaktiven Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger [175] und werden von der Firma Medigenomix (Martinsried) ausgeführt.

2.2.1.13. Klonierung in den RNAi-Expressionsvektor

RNAi-Expressionsvektoren gegen Caspase-8 wurden im pSUPER-Vektor gemäß den publizierten Angaben hergestellt [24].

Der pSUPER-Vektor basiert auf dem pBlueskript-KS-Plasmid von Stratagene und enthält zusätzlich einen H1-Promotor, an den die RNA-Polymerase III bindet. Alle Konstrukte werden nach folgendem Protokoll kloniert:

Auswahl der Zielsequenz:

Die 19 Nukleotid (nt) lange Zielsequenz auf der mRNA, an die die nach der Transfektion in Mammaliazellen produzierten RNAi-Moleküle binden, wird aus Veröffentlichungen entnommen (Caspase-8 Sequenz aus [211]) oder selbst bestimmt. Diese Sequenz darf keine Übereinstimmung mit einer anderen humanen mRNA aufweisen, muss mindestens 100 bp von Beginn und Ende der mRNA entfernt liegen, einen GC-Gehalt von mehr als 30% aufweisen und

möglichst mit „AA“ am 5`- Ende beginnen und mit „TT“ am 3`- Ende schließen. Außerdem dürfen keine vier Adenine oder Thyminen in Folge enthalten sein.

Ermittlung des ersten Oligonukleotides:

5`- GATCCCC - (sense Orientierung der 19 nt langen Zielsequenz) –
TTCAAGAGA - (antisense Orientierung der 19 nt langen Zielsequenz) -
TTTTTGGAAA -3`

Ermittlung des zweiten Oligonukleotides:

5`- AGCTTTTCCAAAA - (sense Orientierung der 19 nt langen Zielsequenz)
– TCTCTTGAA - (antisense Orientierung der 19 nt langen Zielsequenz) - GGG
-3`

Klonierung:

- Phosphorylierung und Hybridisierung der beiden Oligonukleotide (siehe Kapitel 2.2.1.8.)
- Verdau des pSUPER-Vektors mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Hind III, Dephosphorylierung des geschnittenen Plasmids
- Ligation
- Transformation in E.coli DH5 α , Plasmidpräparation
- Test auf Insert durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Hind III; leere Plasmide zeigen Bande bei 300 bp, Plasmide mit dem entsprechenden Insert Bande bei 360 bp

2.2.1.14. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mRNA in die wesentlich stabilere cDNA umgeschrieben. Dabei werden 10 pg bis 5 μ g Gesamt- oder m-RNA mit 200 - 500 ng Oligo-d(T)₁₂₋₁₈ Primer und 1 μ l 10 mM dNTP-Mix in einem Reaktionsvolumen von 13 μ l für 5 Min bei 65°C denaturiert. Nach der Inkubationszeit wird die Reaktion sofort für mindestens 1 Min auf Eis abgekühlt. Dann wird 4 μ l des 5X First-Strand-Puffers, 1 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l RNase Inhibitor RNase OUT und 1 μ l Reverse Transkriptase Superscript III (alles Invitrogen) zugegeben, gemischt und für 1 h bei 50°C inkubiert. Nach der Reaktion muss die Reverse Transkriptase durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert werden. Die noch vorhandene RNA wird zuletzt durch Zugabe von 1 μ l RNase H (Invitrogen) und Inkubation für 20 Min bei 37°C abgebaut. Anschließend wird die cDNA bei –20°C gelagert.

2.2.1.15. cDNA Synthese für die quantitative PCR

Es wird je ein 10 cm Kulturgefäß mit etwa 5×10^6 HepG2-Ntcp-Zellen nicht stimuliert oder mit GCDCA (75 μ M) bzw. mit GCDCA (75 μ M) und Sulfasalazin (100 μ M) für 4h inkubiert. Anschließend isoliert man die Gesamt-RNA mittels *NucleoSpin RNA II* Kit (Machery-Nagel) nach angegebenem Protokoll.

Die Konzentration und Reinheit wird sofort photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.2.). 2 μ g Gesamt-RNA werden pro cDNA-Syntheseansatz bei der Reversen Transkription verwendet (siehe Kapitel 2.2.14.). Die synthetisierte cDNA wird für jede Stimulation vereinigt, gemischt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Pro Stimulation werden so genannte negativ Kontrollen angesetzt, die entweder keinen Oligo-d(T)-Primer, keine Gesamt-RNA oder keine Reverse Transkriptase enthalten. Diese Kontrollen dürfen bei der nachfolgenden quantitativen *real-time* PCR keine Banden erzeugen.

2.2.1.16. quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (RT-PCR) ermöglicht die Amplifikation, Detektion und Quantifizierung einer spezifischen cDNA-Sequenz. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt nach jedem Zyklus der PCR, also in Echtzeit (*real time*), indem die Menge des PCR-Produkts bestimmt wird. Dies erfolgt durch die Detektion der Signalintensität von SYBR Green I, das erst nach Anregung bei 494 nm und Anlagerung an doppelsträngige DNA-Moleküle ein Fluoreszenzsignal bei 521 nm Wellenlänge emittiert. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur doppelsträngigen DNA-Menge.

2.2.1.16.1. Auswahl der Primer

Folgende Anforderungen an die Primer müssen erfüllt sein:

- Länge 18 - 30 Nukleotide
- GC-Gehalt 40 - 60%
- Schmelztemperaturen T_m der Primer sollten ähnlich hoch sein und bei etwa 60°C liegen
- PCR-Amplifikat sollte 100 - 150 bp groß sein
- keine Komplementarität von 2 oder mehr Basen zwischen beiden Primern

- Primer sollten Exon/Intron-Grenze überspannen
- genomische DNA sollte Intron zwischen Primerbindestellen haben (ermöglicht Detektion von genomischer DNA-Kontaminationen)

Vor Durchführung der quantitativen PCR müssen die Bedingungen der PCR optimiert werden, so dass nur ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wird und keine Primer-Dimere entstehen. Da alle doppelsträngigen DNA-Moleküle detektiert werden, würden dies das Ergebnis verfälschen.

2.2.1.16.2. Durchführung der quantitativen PCR

Für einen quantitativen real-time PCR-Ansatz mit 20 µl Endvolumen werden 10 µl 2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden) mit 1 µl 10 µM Primer (sense), 1 µl 10 µM Primer (antisense), 1 - 30 ng cDNA Template und RNase/DNase-freies H₂O in einem für das quantitative PCR-Gerät geeignetem Reaktionsgefäß vereinigt. Während einer Inkubation von 15 Min bei 95°C wird die im Master Mix enthaltene HotStarTaq DNA Polymerase aktiviert. Danach durchläuft der Reaktionsansatz 35 bis 45 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus einer Denaturierungsphase von 15 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 30 s bei 50 - 60°C und einer Synthesephase von 30 s bei 72°C. Nach jeder Synthesephase wird das Fluoreszenzsignal bei 72°C und 75 - 85°C, je nach Stabilität des PCR-Produktes, ermittelt. Nach Beendigung des letzten Zyklus wird eine Schmelzkurve von 50°C bis 99°C erstellt, um die Reinheit des PCR-Produktes zu überprüfen. Danach untersucht man das PCR-Amplifikat auf Spezifität, Größe und Primer-Dimere durch Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.16.3. Erstellen der Standardkurven

Die Standardkurven werden für jedes Zielgen und die endogene Kontrolle durch quantitative PCR-Läufe mit unterschiedlichen Mengen des identischen Standardtemplates durchgeführt. Als Standardtemplate wird cDNA von unbehandelten HepG2-Ntcp-Zellen verwendet. Es werden je 3 Ansätze mit Standard-cDNA in den Verdünnungen 1:10 bis 1:1000 amplifiziert.

Verdünnung der cDNA	Eingesetztes Volumen	Menge an Gesamt-RNA
1:10	8 µl	80 ng
1:20	8 µl	40 ng
1:50	8 µl	16 ng
1:100	8 µl	8 ng
1:200	8 µl	4 ng
1:500	8 µl	1,6 ng
1:1000	8 µl	0,8 ng

Tabelle 4: Pipetierschema für die Standardkurven

Zur Erstellung der Standardkurve werden die C_T -Werte auf der x-Achse gegen den Logarithmus der Gesamt-RNA Mengen, aus der die im Ansatz enthaltene cDNA hervorgegangen ist, aufgetragen. Durch die Punkte wird eine Regressionsgerade gelegt, diese entspricht der Gleichung der Standardkurve.

2.2.1.16.4. Ermittlung der Ergebnisse nach der relativen Standardkurven-Methode

Die Quantifizierung erfolgt durch die relative Standardkurven-Methode, die eine relative Quantifizierung der Zielsequenz-mRNA in unterschiedlichen Proben ermöglicht. Durch diese Methode können keine Aussagen über die absoluten Mengen gemacht werden. Es wird die mRNA Menge eines Zielgens in unterschiedlichen Proben verglichen. Zuerst wird der C_T -Wert jeder Probe bestimmt. Der C_T -Wert gibt den Zyklus der PCR an, in dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dieser Schwellenwert gilt für alle Proben eines PCR-Laufes. Er befindet sich am Ende des ersten Drittels der exponentiellen Amplifizierungs-Phase und wird für jeden PCR-Lauf manuell eingegeben. Für jede Probe werden zwei PCR-Reaktionen in separaten Reaktionsgefäßen durchgeführt, wobei im ersten die Zielsequenz und im zweiten die endogene Kontrollsequenz amplifiziert wird. Als endogene Kontrolle, auch *housekeeping-gene* genannt, wird GAPDH verwendet, dessen Expression sich bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht ändert. Die C_T -Werte der Zielsequenz und der

endogenen Kontrolle werden in die Regressionsgleichung der zuvor ermittelten Standardverdünnungsreihe eingesetzt. Dies gibt die im Template vorhandene Menge der Zielsequenz bzw. der endogenen Kontrolle wieder. Um Fehler und Schwankungen aufgrund der Pipettierungenauigkeit oder der differierenden Effizienzen bei der Reversen Transkription bei der cDNA-Synthese auszuschließen, werden die Quotienten der Mengen an Zielsequenz und GAPDH ermittelt und verglichen. Damit unterschiedliche PCR-Läufe verglichen werden können, normalisiert man die Quotienten aller Versuchsbedingungen mit der unstimulierten Probe als Kalibrator.

2.2.1.17. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl werden etwa 100 ng Template (z.B. cDNA), je 10 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x Polymerasepuffer, 1,25 U (Units) DNA-Polymerase (Roche) und das erforderliche Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchläuft der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 1 Min bei 52 - 58°C und einer Synthesephase von 2 Min/1000bp Amplifikat bei 72°C. Anschließend wird sieben Minuten bei 72°C inkubiert, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden können. Zuletzt wird der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt. Die jeweiligen PCR-Amplifikate werden über Agarose-Gelelektrophorese überprüft und gegebenenfalls aufgereinigt.

2.2.1.18. Microarray

Der Microarray oder Genchip ermöglicht die Expressionsanalyse vieler hundert Gene in nur einem Experiment. Es wird die Genexpression unter verschiedenen Bedingungen bzw. Stimulationen oder in unterschiedlichen Zellen bzw. Geweben miteinander verglichen. Das verwendete PIQOR cDNA Array System (Memorec, Köln) ermöglicht die Markierung der Proben mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, so dass immer zwei unterschiedliche Proben miteinander verglichen werden können.

2.2.1.18.1. *Probenvorbereitung*

Stimulation

5 x 10⁶ Zellen werden nach der Stimulation mit PBS gewaschen, 5 Min mit 350 x g zentrifugiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

mRNA-Isolation

Als Nächstes wird die Gesamt-RNA aus den Zellen mit dem „NucleoSpin RNA II“-Kit (Machery-Nagel, Düren) isoliert und deren Qualität und Quantität mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) analysiert. Zu 100 µg Gesamt-RNA gibt man 20 fmol Kontroll-RNA-1. Aus diesem Ansatz wird die mRNA über die Poly(A)-Enden mittels Oligotex Kit (Qiagen, Hilden) unter Befolgung des vom Hersteller angegeben Protokolls in einem Volumen von 17 µl angereichert. Nach der Poly(A)-Anreicherung wird 2 µl Kontroll-RNA-2 (0,5 - 1,5 µg) zugegeben. Kontroll-RNA-1 und -2 ermöglichen später die Überprüfung der Poly(A)-Anreicherung, der Fluoreszenzmarkierung und der Hybridisierung.

cDNA-Synthese und Fluoreszenzmarkierung

Anschließend erfolgt die Transkription der mRNA in cDNA unter gleichzeitiger Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff. Die mRNA der auf dem Microarray zu analysierenden Proben werden mit unterschiedlichen Farbstoffen, Cy3 und Cy5, gekennzeichnet. Zu den 19 µl RNA-Lösung werden 8 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl Primer-Mix, 2 µl dNTP-Mix (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 4 mM dCTP), 4 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNasin (20 – 40 U), 2 µl FluoroLink Cy3/Cy5-dCTP gegeben und gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Min bei 65°C wird der Ansatz auf 42°C abgekühlt. Es wird 1 µl Reverse Transkriptase SuperScript II (200 U) zugegeben und 30 Min bei 42°C inkubiert. Danach wird nochmals 1 µl SuperScript II zugegeben und 30 Min bei 42°C inkubiert. Um störende RNA zu hydrolysieren wird der Reaktionsansatz mit 0,5 µl RNase H für 20 Min bei 37°C inkubiert.

Aufreinigung und Denaturierung

Als Nächstes werden die markierten cDNAs der beiden Proben vereinigt und über eine QIAquick Spin-Säule aufgereinigt. Dazu gibt man 400 µl Puffer PB (Qiagen) zu dem cDNA-Mix und belädt die Säule durch Zentrifugation für 30 - 60 s bei 1000 x g.

Danach wird die Probe mit 750 µl PE Puffer (Qiagen) gewaschen und mit 30 µl DNase/RNase-freiem H₂O (pH 8,0) in ein frisches, steriles Reaktionsgefäß eluiert. Das Eluat wird unter Vakuum bei 45°C auf etwa 10 µl eingengt und mit 10 µl 2x Hybridisierungslösung (Memorec) verdünnt. Während der Microarray vorbereitet wird, bewahrt man die markierten, aufgereinigten cDNAs bei RT im Dunkeln auf.

2.2.1.18.2. Durchführung

Vorbehandlung des Microarrays

Die doppelsträngigen cDNA Moleküle, die auf dem Microarray gespottet sind, werden durch Inkubation für 2 Min bei 95°C in destilliertem Wasser denaturiert, so dass nur der sense-Strang auf dem Genchip verbleibt. Anschließend wird der Genchip sofort in 96% Ethanol für 30 s gelegt und in einer staubfreien Umgebung getrocknet.

Danach wird der Microarray prähybridisiert indem die Prähybridisierungslösung (Memorec) auf 98°C für 2 Min erhitzt, dann auf 42°C abgekühlt wird und 20 µl davon auf den Array gegeben werden. Der Microarray wird daraufhin mit einem Deckgläschen vorsichtig bedeckt und in die Hybridisierungskammer PIQOR HybChamb (Memorec) gegeben, damit der Array nicht austrocknet. Die Hybridisierungskammer wird für 30 Min in einen Thermalcycler gelegt, dessen Boden auf 62°C und dessen Deckel auf 68°C temperiert worden sind. Die Prähybridisierung dient der Minimierung des Hintergrundsignals.

Hybridisierung

Nachfolgend wird der Microarray mit der markierten Probe hybridisiert. Dabei lässt man die Hybridisierungskammer mit dem Microarray auf RT abkühlen, während man den markierten, aufgereinigten cDNA-Mix auf 65°C für 2 Min erhitzt. 20 µl der cDNA-Lösung werden auf den Microarray gleichmäßig verteilt und mit einem Deckgläschen vorsichtig abgedeckt. Der Chip wird mit der Hybridisierungskammer in den Thermalcycler gegeben, dessen Boden auf 62°C und dessen Deckel auf 68°C temperiert sind.

Waschen

Nach 14 h wird der Array in mehreren Schritten gewaschen. Zuerst zweimal in 50 ml 1 x Waschpuffer 1 (Memorec) für 5 Min bei 50°C, dann zweimal in 50 ml 1 x Waschpuffer 2 (Memorec) für 5 Min bei 50°C.

2.2.1.18.3. Auswertung

Nach Trocknung in einer staubfreien Umgebung erfolgt die primäre Auswertung mittels eines speziell entwickelten Scanners. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe werden nacheinander angeregt und die Emissionen werden aufgezeichnet. Anschließend werden die Expressionsmuster übereinander gelegt. In den Overlays erscheinen Signale mit stärkerer Cy5-Fluoreszenz rot; mit stärkerer Cy3-Fluoreszenz grün. Sie zeigen, dass das entsprechende Gen in der Cy5 bzw. Cy3-markierten Probe stärker exprimiert wurde. Gelbe Signale treten auf, wenn beide Fluoreszenzen die gleiche Intensität aufweisen und das entsprechende Gen in beiden Proben gleich stark exprimiert wurde.

Um optimale Ergebnisse zu erhalten und die benötigten Geräte nicht anschaffen zu müssen, wurden die Proben nach der Stimulation durch die Firma Memorec aufgearbeitet und der Microarray ausgewertet.

2.2.2. Prokaryontische Methoden

2.2.2.1. Herstellung kompetenter E.coli

Die Herstellung chemokompetenter E.coli, die durch den so genannten „Hitzeschock“ transformiert werden sollen, erfolgt durch Animpfen von 50 ml LB-Medium mit 500 µl einer stationären E.coli-Kultur (z.B. DH5α). Die Bakteriensuspension wird bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Dann werden die Bakterien bei 4°C und 2000 x g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation für 10 Min auf Eis werden 500 µl 87% (w/v) Glycerin zugegeben. Aliquots zu 100 µl werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2. Transformation durch Hitzeschock

Die Transformation chemokompetenter E.coli erfolgt durch Hitzeschock. Kompetente Bakterien werden langsam auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligation oder 1 µg Plasmid DNA auf Eis für 30 Min inkubiert. Anschließend werden die Bakterien mit der zugegebenen DNA für 90 s einer Temperatur von 42°C (Hitzeschock) ausgesetzt. Danach werden sie sofort für 2 Min auf Eis gestellt, bevor 1 ml SOC-Medium zugegeben wird. Die Bakterien werden 60 Min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Bakteriensuspension auf vorgewärmte Agar-Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgt bei 37°C bis zu 24 h.

2.2.3. Eukaryontische Methoden

2.2.3.1. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten werden unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt. Die Zellen werden im oben angeführtem Medium (siehe 2.1.10.2. Medien für eukaryontische Zellkultur) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) gehalten. Bei einer Zelldichte von ca. 80 - 90% Konfluenz werden die Zellen mit PBS gewaschen und circa 5 Min in 1x Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert bis sie sich nach leichtem Klopfen gegen den Kulturschalenboden ablösen. Anschließend werden sie mit etwa dem doppelten Volumen Medium in ein Falconröhrchen überführt und für 5 Min bei 500 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl kann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt werden indem man 10 µl der Suspension in die Zählkammer gibt und die vier Quadranten der Kammer auszählt. Die Summe der vier Quadranten wird durch 0,4 dividiert. Eine Multiplikation mit dem Faktor 1000 ergibt die Zellzahl pro ml. Danach kann die optimale Zellzahl auf Kulturschalen ausgebracht werden.

2.2.3.2. Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zelllinien

Beim Einfrieren werden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 x Trypsin-EDTA abgelöst und mit dem doppelten Volumen Medium gemischt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation wird das Zellpellet in 4 ml Einfriermedium resuspendiert und in 3 Kryo-Röhrchen (Nalgene) zu je 1,3 ml aufgeteilt. Anschließend werden die Zellen in einer Styroporbox langsam auf -80°C abgekühlt. Zur längerfristigen Lagerung werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Beim Auftauen werden die Zellen in ein 37°C Wasserbad gegeben, sofort nach dem Auftauen mit frischem Medium verdünnt und auf Zellkulturschalen ausgebracht.

2.2.3.3. Transfektion von eukaryontischen Zelllinien

Die Transfektion eukaryontischer Zelllinien kann mittels unterschiedlicher Methoden durchgeführt werden. In dieser Arbeit werden die Zellen mit Fugene (Roche), Oligofectamine (Invitrogene) und Lipofectamine (Invitrogen) transfiziert.

2.2.3.3.1. Transiente Transfektion von DNA

Fugene

Adhärenente HepG2- und Huh7- Zellen werden mit dem Transfektionsreagenz Fugene der Firma Roche transfiziert. 24 h vor der Transfektion werden die Zellen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion ungefähr 40 - 70% konfluent sind. Bei der Transfektion wird das Fugene-Reagenz ohne Berührung der Reaktionsgefäßwand direkt in Optimem-Medium (Gibco, Carlsbad, USA) pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wird die DNA zugegeben. Danach wird der Transfektionsansatz vorsichtig gemischt und 15 - 20 Min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit werden die Zellen mit PBS oder Medium gewaschen und mit Standardmedium versetzt. Nach der Inkubationszeit wird der Transfektionsansatz sofort auf die Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen werden je nach Versuchsbedingung für 12 – 72 h in Standardmedium weiterkultiviert.

Zellen	Format	Volumen OPTIMEM	Volumen Fugene	Menge DNA	Volumen Standardmedium
HepG2	6-well	100 µl	4 µl	2 µg	2 ml
HepG2	12-well	100 µl	0,5 µl	0,2 µg	1 ml
HepG2	96-well	5 µl	0,15 µl	0,05 µg	100 µl
Huh7	6-well	100 µl	2 µl	1 µg	2 ml
Huh7	96-well	5 µl	0,075 µl	0,025 µg	100 µl

Tabelle 5: DNA-Transfektion mittels Fugene

Lipofectamine

Adhärente Hep3B-Ntcp Zellen werden im 6-well Format ausgesäht und 24h später mit einer Konfluenz von circa 40 - 70% mit Lipofectamine transfiziert. Zu 100 µl Optimem werden 4 µl Lipofectamine und 1 µg DNA gegeben. In einem separaten Gefäß werden 100 µl Optimem und 6 µl Plus-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min bei RT werden beide Ansätze vereinigt und nochmals 15 Min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit werden die Zellen mit PBS oder Medium ohne Antibiotika und ohne FCS gewaschen. Es werden 800 µl Medium ohne Antibiotika und ohne FCS auf die Zellen im 6-Well gegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden 200 µl Transfektionsansatz zugegeben. Nach 5 h gibt man 1ml Medium mit 20% FCS und ohne Antibiotika zu. Nach 24 h wird das Medium vollständig gewechselt.

2.2.3.3.2. *Transiente Transfektion von Oligonukleotiden*

Zur Transfektion von doppelsträngigen RNA-Oligonukleotiden in HepG2-Ntcp-Zellen wird Oligofectamine (Invitrogene) benutzt. Die Zellen werden 24 h vor der Transfektion ausgezählt. Anschliessend werden 100000 Zellen pro 12-well Vertiefung ausgesät. Es ist darauf zu achten, dass das Medium 10% FCS sowie alle Zusätze, allerdings keine Antibiotika, enthält. Die Oligofectamine-Transfektion erfolgt nach dem Transfektionsprotokoll der Firma Invitrogen. Im 12-well Format werden pro Vertiefung 5 µl siRNA-Oligonukleotid (2 µM) mit 85 µl Optimem (Gibco) gemischt. In einem separatem Reaktionsgefäß werden 2 µl Oligofectamine mit 8 µl Optimem

versetzt und 5 - 10 Min bei RT inkubiert. Danach werden die 90 µl des siRNA-Optimem-Gemisches mit den 10 µl Oligofectamine-Optimem-Mix vereinigt und 20 Min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit werden die Zellen zweimal mit PBS oder Medium mit Zusätzen, aber ohne Antibiotika und FCS, gewaschen. Zuletzt werden 400 µl Medium ohne Antibiotika und FCS auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit gibt man 100 µl Transfektionsansatz zu den Zellen. Vier Stunden später werden 250 µl Medium ohne Antibiotika mit 30% FCS zugegeben. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel. Die Zellen können aber auch nach 24 h durch 1 x Trypsin-EDTA abgelöst und wieder neu ausgesät werden.

2.2.3.3.3. Stabile Transfektion

Zur Herstellung stabiler Zellklone werden Zellen im 6-well-Format durch Fugene mit dem Plasmid, das das Resistenzgen gegen zum Beispiel G418 oder Puromycin trägt, transfiziert. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 1 x Trypsin-EDTA abgelöst und auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Zwei Tage nach der Transfektion beginnt man mit der Selektion der transfizierten Zellen durch Zugabe des Antibiotikums (G418 (Gibco) in der Endkonzentration 1mg/ml; Puromycin (ICN, Irvine, USA) in der Endkonzentration 1 µg/ml). Danach beobachtet man die Zellen, wechselt in regelmäßigen Abständen das Medium und hält die Zellen solange im Selektionsmedium bis sich einzelne Kolonien bilden. Diese werden auf separate Kulturgefäße vereinzelt und im Selektionsmedium weiter kultiviert und gegebenenfalls auf größere Kulturgefäße übertragen. Sobald genügend Zellen eines Zellklones vorhanden sind, wird die stabile Integration des Expressionsplasmids in das Genom der Zellen mittels Western-Blot oder Gallensäureaufnahme überprüft. Als Kontrolle wird die Selektionierung zusätzlich mit Zellen durchgeführt, die nicht mit dem Resistenzplasmid transfiziert worden sind. Diese Zellen bilden keine resistenten Kolonien; alle Zellen sterben ab. Für die weitere Kultivierung kann die Konzentration des Selektionsantibiotikums auf 0,4 mg/ml (G418) beziehungsweise 0,5 µg/ml (Puromycin) reduziert werden.

2.2.3.4. [³H]-Taurocholsäure-Aufnahme

Die Gallensäureaufnahme der Leberzellen wird mit [³H]-markierter Taurocholsäure bestimmt. Konfluente Zellen werden im 6-well Format dreimal mit 1 ml [³H]-TCA-Aufnahme-Puffer (37°C) gewaschen. Dann werden die Zellen mit 0,5 ml [³H]-TCA-Inkubations-Puffer, der 10 µM [³H]-Taurocholat enthält, für 20 Min bei 37°C im Brutschrank ohne CO₂ inkubiert. Anschließend wird nicht aufgenommene, [³H]-markierte Taurocholsäure durch dreimaliges Waschen mit 1 ml eiskaltem [³H]-TCA-Stop-Puffer entfernt. Zugabe von 0,5 ml 1% Triton X-100 und Schütteln bei RT lysiert die Zellen und gibt die aufgenommene radioaktive Gallensäure frei. 400 µl des Lysats werden zu 10 ml Szintillationslösung gegeben und im Flüssigszintillationszähler gemessen. Das restliche Lysat wird zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet und dient der Normierung der Gallensäureaufnahme.

2.2.3.5. Nachweis der Apoptose

2.2.3.5.1. Nachweis der Apoptose mittels Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/-7-Assay

Um die Aktivität der Caspasen-3 und -7 unter bestimmten Versuchsbedingungen zu messen, werden Zellen, die stabil mit dem Ntcp-Transporter transfiziert wurden, 24 h bis 72 h vor Durchführung des Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/-7-Assays (Promega) im 96-well Format ausgesät. Die Stimulation erfolgt stets in 50 µl Medium ohne Zusätze. Nach der Stimulation wird 50 µl Caspase-3/-7-Reagenz zugegeben, das aus dem Caspase-3/-7-Substrat Z-DEVD-R110 (1:100) und Caspase-3/-7 Puffer besteht. Der Puffer lysiert die Zellen und bietet die optimalen Bedingungen für die enzymatische Aktivität der Caspasen. Das präfluoreszierende Substrat wird durch aktive Caspase-3 und -7 geschnitten, wodurch fluoreszierendes Rhodamin 110 freigesetzt wird. Nach Zugabe des Caspase-3/-7-Reagenzes wird die 96-well Platte abgedeckt für 2 h bei RT und 300 – 500 rpm geschüttelt. Die Aktivität der Caspasen-3/-7 wird im Cytofluor bei einer Exikation von 485 ± 20 nm und einer Emission bei 530 ± 25 nm bestimmt. Um mehrere Versuche vergleichen zu können, wird die nicht stimulierte negative Kontrolle gleich 1 gesetzt.

2.2.3.5.2. Nachweis der Apoptose mittels Caspase-Glo 8/9 Assay

Bei der Rezeptor-vermittelten Apoptoseinduktion wird Caspase-8; bei der Mitochondrien-vermittelten Apoptoseinduktion dagegen Caspase-9 aktiviert. Die Aktivität von Caspase-8 bzw. Caspase-9 kann durch den Caspase-Glo 8 bzw. Caspase-Glo 9 Assay (beides Promega) ermittelt werden. Beide Assays unterscheiden sich nur in der Aminosäuresequenz des Substrates, die von der aktiven Caspase erkannt und geschnitten wird. Die Zellen werden 48 h vor der Durchführung des Assays im 12-well Format ausgesät. Nach der Stimulation werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS mit dem Zellschaber abgelöst und gut resuspendiert. 35 µl der Zellsuspension werden mit 35 µl Caspase-Glo Reagenz in einem Luminometerröhrchen vereinigt und bei 300 - 500 rpm für etwa 30 s gemischt. Das Reagenz wird durch Lösen des Substrates im Caspase-Glo Buffer hergestellt und wird bei -20°C bis zur Verwendung in kleinen Aliquots aufbewahrt. Nach dem Mischen wird die Probe im Dunkeln für 30 Min bei RT inkubiert bevor sie im Luminometer gemessen wird. Sollte das Signal zu stark sein wird jede Probe mit PBS verdünnt. Um mehrere Versuche vergleichen zu können, wird die nicht stimulierte negative Kontrolle gleich 1 gesetzt.

2.2.3.6. Luciferase-Reportergen-Assay

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 wird durch den Luciferase-Reportergen-Assay ermittelt. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors wird durch den *upstream* vom *Firefly*-Luciferase-Gen gelegenen Collagenase-Promotor, der eine AP-1 Erkennungssequenz (5'-TGA_C^GTA_C^A-3') aufweist, gemessen. Ein Plasmid mit dem konstitutionell aktiven Thymidinkinase-Promotor *upstream* des *Renilla*-Luciferase-Gens wird verwendet, um die schwankende Transfektionseffizienz zu ermitteln. 100000 HepG2-Ntcp Zellen werden pro 12-well Vertiefung ausgesät und nach 24 h transfiziert. Die Transfektion wird mit 200 ng Gesamt-DNA und 0,5 µl Fugene pro Vertiefung durchgeführt. Die Plasmide Collagenase-*Firefly*-Luciferase und Thymidinkinase-*Renilla*-Luciferase werden im Verhältnis 5:1 eingesetzt. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen für die angegebene Dauer stimuliert, mit PBS

gewaschen und durch etwa 5 minütige Inkubation bei RT unter kräftigem Schütteln in 250 μ l 1 x passiven Lysepuffer (Promega) lysiert. Das Lysat wird bei -20°C weggefroren, da dies die Signalintensität verstärkt. 10 μ l Lysat werden mit 50 μ l LARII-Substrat in einem Luminometer-Röhrchen vermengt. Die Intensität der *Firefly* Luciferase wird sofort über einen Zeitraum von 10 s im TD-20/20 Luminometer ermittelt. Anschließend werden 50 μ l Stop & Glow-Puffer mit *Renilla*-Luciferase Substrat zugegeben und etwa 5 s gevortext. Dann erfolgt augenblicklich die Messung der Intensität der *Renilla* Luciferase über einen Zeitraum von 10 s im TD-20/20 Luminometer. Die Ratio *Firefly*/*Renilla*-Luciferase zeigt die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1.

2.2.3.7. Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen

Konfluente HepG2-Ntcp Zellen werden 24 h nach der Aussaat im 96-well Format 2 h mit Gallensäuren stimuliert. Danach werden sie dreimal mit auf 37°C temperiertem PBS gewaschen und mit 4 μM Carboxy- H_2DCFDA (Dichlorodihydrofluoreszin-Diacetat) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in PBS für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird ohne vorheriges Waschen die Fluoreszenz im Cytofluor mit der Anregung bei $485 \pm 20\text{nm}$ und Emission bei $530 \pm 25\text{ nm}$ ermittelt. Die Stammlösung von Carboxy- H_2DCFDA mit 1 mg/ml wird stets frisch im mit Argon begasten DMSO hergestellt.

2.2.4. Proteinchemische Methoden

2.2.4.1. Herstellung von Gesamtzelllysaten

Bei der Präparation von Gesamtzelllysaten werden die Zellen mit PBS gewaschen, vorsichtig mit einem Gummischaber von der Kulturgefäßoberfläche entfernt, in ein Reaktionsgefäß oder Falcon-Röhrchen überführt und 5 Min bei 350 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird entweder bei -20°C weggefroren oder direkt weiterverarbeitet. Dabei resuspendiert man das Zellpellet mit dem etwa fünffachen Volumen an Lysepuffer, inkubiert 5 Min auf Eis, sonifiziert circa 5 s und zentrifugiert für 7 Min bei 14000 x g und 4°C . Das Gesamtzelllysat befindet sich im Überstand und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, das aus Zelltrümmern und

Membranfragmenten besteht, wird verworfen. Die Lysate werden sofort weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.2. Isolierung von nukleären Proteinen

Der etwa 75% konfluente Zellrasen wird 3x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und mit einem Zellschaber in PBS abgelöst. Nach 5 Min Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C wird das Pellet in 400 μl Kernextraktionspuffer A resuspendiert und 15 Min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 25 μl 10% NP-40 und 10 s vortexen lysiert. Anschließend werden die Lysate 1 Min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand beinhaltet die cytosolischen Proteine. Das Pellet wird in 50 μl Kernextraktionspuffer B aufgenommen und 15 min bei 4°C geschüttelt, um die Kernproteine herauszulösen. Als Nächstes werden störende Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C für 5 Min abgetrennt. Der Überstand mit den nukleären Proteinen wird bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.4.3.1. Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit dem "BioRad Protein Microassay" der Firma BioRad (München). Dabei wird zur späteren Berechnung des Proteingehalts eine Immunglobulin G-Verdünnungsreihe angesetzt. Außerdem werden 1 μl Zelllysat 1:800 in ddH₂O verdünnt. Anschließend versetzt man die Proteinverdünnungen mit 200 μl der Microassay-Lösung. Nach 10 Min Inkubation wird die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen erfolgt durch den Vergleich mit den Standardverdünnungen.

2.2.4.3.2. Lowry

Die Konzentrationsbestimmung von nukleären Extrakten wird gemäß dem Protokoll nach Lowry (Lowry et al., 1951) durchgeführt. Zuerst werden die Lösungen hergestellt: Lösung 1 besteht aus 50 ml Lowry-Lösung A, 500 μl Lowry-Lösung B1 und 500 μl Lowry-Lösung B2; Lösung 2 beinhaltet 2,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz und 2,5 ml ddH₂O. Dann werden Verdünnungen des BSA-Standards

bzw. der Proben (1:100) hergestellt. Zu 200 µl der Standard- oder Proben-Verdünnungen wird 1 ml Lösung 1 pipettiert, gevortext und 10 Min bei RT inkubiert. Anschließend werden 100 µl Lösung 2 zugegeben und gevortext. Nach 30 Min Inkubation bei RT im Dunkeln wird die Extinktion bei 650 nm Wellenlänge ermittelt. Die Berechnung des Proteingehaltes der Proben erfolgt durch Ermittlung der linearen Regression der Extinktionswerte der Standardreihe unter Berücksichtigung der Probenverdünnung.

2.2.4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Man benutzt die denaturierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese um Proteine der Größe nach aufzutrennen [110]. Das Gel wird hergestellt, indem die Bestandteile des Trenngels, 40% (w/v) Acrylamid/N'N'-Methylen-Bis-Acrylamid Lösung 29:1 (Biorad, Hercules, USA), Trenngelpuffer, ddH₂O, SDS, APS und TEMED, gemischt und zwischen 2 Glasscheiben gegeben werden. Anschließend wird mit Isopropanol überschichtet. Je nach Molekulargewicht des aufzutrennenden Proteins variiert die Menge an eingesetztem Acrylamid. In der Regel benutzt man 8%ige bis 15%ige Gele. Nach etwa 45 Min ist das Trenngel polymerisiert. Als Nächstes wird das 4%ige oder 5%ige Sammelgel, bestehend aus 40% (w/v) Acrylamid/N'N'-Methylen-Bis-Acrylamid Lösung 29:1 (Biorad, Hercules, USA), Sammelgelpuffer, ddH₂O, SDS, APS und TEMED, gemischt, circa 1 cm hoch auf das schon polymerisierte Trenngel gegossen und ein Kamm hineingesteckt, damit die späteren Probenauftragstaschen ausgebildet werden. Nach der vollständigen Polymerisation wird der Kamm vorsichtig herausgezogen, das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer (Bio-Rad) eingebaut und die Kammer wird mit SDS-haltigem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Min bei 95°C aufgeköcht. Dann werden sie in die Probenauftragstaschen pipettiert. Die durch das SDS denaturierten und stark negativ geladenen Proteine wandern nach dem Anlegen einer Spannung von 10 - 20 V/cm zur Anode, wobei sie zunächst in dem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und dann in dem höherprozentigen Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt werden.

2.2.4.5. Coomassie-Färbung

Das Gel (siehe 2.2.4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)) wird zum Sichtbarmachen der Proteine für 15 Min in 12% Trichloressigsäure, für mindestens 60 Min in Coomassie-Färbelösung und dann in Entfärbelösung gelegt. Dann kann es digital dokumentiert und getrocknet werden.

2.2.4.6. Western-Blot

Der Western-Blot ermöglicht den Nachweis von spezifischen Proteinen auf Immunoblot-Membranen durch Antikörper. Dabei werden zuerst Gesamtzelllysate oder andere Proteinlösungen durch SDS-PAGE (siehe 2.2.4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)) aufgetrennt und dann auf eine PVDF-Membran übertragen. Dabei wird eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, einige Sekunden in Methanol, eine Minute in ddH₂O und dann für mehrere Minuten in den Transferpuffer gelegt. Die Übertragung erfolgt in einer Tank-Transferkammer der Firma Bio-Rad. Dabei folgt auf die Kathode ein Schwämmchen, eine Lage Whatmann-Filterpapier, das Gel, die vorbehandelte Membran, eine Lage Whatmann-Filterpapier und ein weiteres Schwämmchen. Nach dem Anlegen einer Spannung von 100 V für 60 Min, wandern die Proteine von der Kathode zur Anode, d.h. sie verlassen das Gel und werden auf die Membran transferiert.

Als nächstes wird die Membran für mindestens 60 Min in die Blocklösung gelegt und leicht bei RT geschüttelt.

Nach dem Blocken wird die Membran mit dem primären, für das Protein spezifischen Antikörper hybridisiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt in einer geeigneten Verdünnung in TBS-T allein oder mit 5% (w/v) Magermilch bzw. BSA für mindestens 90 Min unter Schütteln bei RT. Meist wird aber bei 4°C über Nacht inkubiert.

Anschließend wird die Membran mindestens dreimal für je 5 Min in TBS-T gewaschen. Dann wird die Membran mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten Sekundärantikörper für etwa 90 Min bei RT hybridisiert. Dieser sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper wird ebenfalls in TBS-T allein oder mit 5% (w/v) Magermilch bzw. BSA in einer geeigneten Verdünnung eingesetzt. Danach wird dreimal mit TBS-T gewaschen.

Anschließend werden die Signale durch Chemolumineszenz detektiert. Nach Zugabe der ECL-Lösung katalysiert die Peroxidase des Sekundärantikörpers eine Chemolumineszenzreaktion, die einen Röntgenfilm schwärzt.

Um auf dem gleichen Western-Blot noch weitere Proteine zu untersuchen, müssen die hybridisierten Antikörper von der Membran abgelöst werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „stripper“. Dazu inkubiert man die Membran mit 10 ml *Stripping* Puffer und 100 µl Mercaptoethanol für 15 Min bei 60°C unter Schütteln. Danach wird die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, 60 Min in TBS-T allein oder mit 5% (w/v) Milch bzw. BSA geblockt und dann mit dem für das Protein spezifischem Antikörper hybridisiert.

2.2.4.7. Immunocytologie

18 x 18 mm große Deckgläschen werden 4 h in 1 M HCl bei 55°C inkubiert, anschließend mit ddH₂O gewaschen und dreimal für 30 Min im Ultraschallbad behandelt. Hinterher werden sie je 30 Min in eine aufsteigende Ethanolreihe von 50%, 70% und 95% gelegt. In 95% Ethanol werden sie bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Zellen werden auf die vorbehandelten, sterilen Deckgläschen im 6-well ausgesät. Die konfluenten Zellen werden nach eventueller Stimulation durch eine 20-minütige Inkubation bei 4°C in 3% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend werden die Gläschen dreimal für 5 Min mit TBS-T gespült und für 1 h mit 5% BSA in TBST bei RT geblockt. Danach werden die Gläschen vorsichtig mit den Zellen nach oben auf einen Parafilm gelegt. Es werden 100 µl des primären Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung (meist 1:100) in 5% BSA zugegeben und für 24 h bei 4°C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Danach spült man dreimal für 5 Min mit TBS-T und legt die Gläschen abermals auf einen Parafilm. Man inkubiert das Präparat mit 200 µl des Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers in 5% BSA (Verdünnung meist 1:200). Falls eine Kernfärbung gewünscht ist, wird der Farbstoff Höchst 33342 in der Verdünnung 1:200 zusätzlich zugegeben. Nach 1-stündiger Inkubation bei RT wird dreimal für 5 Minuten mit TBS-T und zweimal für 5 Min mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wird das Präparat mit *Vectarshield mountig medium* (Vector Laboratories) eingedeckt und auf einen Objektträger gegeben. Nach dem Trocknen können die Ränder noch mit Nagellack versiegelt werden. Das Präparat kann für etwa 3 Wochen aufbewahrt werden. Es ist unbedingt darauf zu

achten, dass sowohl der Sekundärantikörper als auch Höchst 33342 lichtsensibel sind und dass das Präparat stets im Dunkeln aufbewahrt wird.

2.2.4.8. Electromobility shift assay (EMSA)

Im *Electromobility shift assay*, kurz EMSA, bindet der im Kernextrakt vorhandene Transkriptionsfaktor an ³²P-markiertes Oligonukleotid. Dieses Oligonukleotid trägt die spezifische Bindungssequenz für den entsprechenden Transkriptionsfaktor.

Vorbereitung der Proben

Konfluente HepG2-Ntcp werden im 6-well stimuliert. Die Kernextrakte werden, wie in Kapitel 2.2.4.2. beschrieben, isoliert und der Proteingehalt wird mittels Lowry Assay (siehe Kapitel 2.2.4.3.2.) bestimmt.

³²P-Markierung des Oligonukleotides

2 µl Oligonukleotid (1,75 pM) werden mit 1 µl T4-Polynukleotidkinase Puffer, 5 µl Nuklease-freiem H₂O, 1 µl ³²P-ATP (3000 Ci/mM) (Amersham, Little Chalfont, England) und 1 µl T4-Polynukleotidkinase (PNK) (USB, Cleveland, USA) in einem Endvolumen von 10 µl zusammengegeben und für 10 Min bei 37°C inkubiert. Danach wird die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Inzwischen wird die Flüssigkeit in den Mini Quick Spin Säulchen (Roche, Mannheim) resuspendiert, die Kappen entfernt und 1 Min bei 1000 x g und RT in ein steriles Reaktionsgefäß zentrifugiert. Als Nächstes wird das markierte Oligonukleotid über die Säulchen durch Zentrifugation bei RT und 1000 x g für 4 Min von der freien Radioaktivität getrennt. 2 µl des Eluats werden in 10 ml Szintillationslösung gegeben und im Flüssigszintillations-Analyser gemessen. Um optimale Banden im EMSA zu erhalten, erfolgt die Elution in ein steriles, zuvor mit Kollagen beschichtetes Reaktionsgefäß. Das markierte Oligonukleotid wird bei 4°C gelagert.

Herstellung des Gels

Die Auftrennung der Oligonukleotid-Protein-Komplexe erfolgt in einem nicht-denaturierendem Gel. Man pipettiert für 2 Gele 1 ml EMSA-10 x TBE, 3 ml 30% Acrylamid (37,5 : 1), 500 µl 100% Glycerin und 15,5 ml ddH₂O zusammen und entgast für 10 Min. Anschließend gibt man 10 µl TEMED und 150 µl 10% APS zu,

gießt das Gel und steckt die Kämme für die Probenaufnahmetaschen hinein. Die Polymerisation erfolgt für 2 h bei RT.

Versuchsdurchführung

Die hergestellten Gele werden in die Gelelektrophoresekammer eingebaut und für 30 Min bei 100 V angeschlossen. Zuerst wird der fertige Bindungs-Puffer durch Mischung von 450 µl 5 x EMSA-Bindungs-Puffer mit 1,3 µl 1 M DTT und 50 µl EMSA-Lade-Puffer hergestellt. Dann werden 5 - 20 µg der Kernextrakte mit 1 µl Polydid C (2 µg/µl), 3 µl fertigem Bindungs-Puffer und ddH₂O in einem Endvolumen von 14 µl vermengt und 5 – 10 Min bei RT inkubiert. Dann werden die Proben auf Eis gestellt und 1 µl der markierten Oligonukleotids zugegeben. Diese Reaktion wird 30 Min bei RT inkubiert, so dass die Protein-Oligonukleotid-Komplexe entstehen können. Danach wird die gesamte Reaktion in die Geltaschen aufgetragen und für etwa 1 h bei 100 V aufgetrennt.

Auswertung

Das Gel wird vorsichtig aus der Kammer ausgebaut und von den Glasplatten gelöst. Man schlägt es in Folie ein, legt einen radiosensitiven Film auf und friert die Kassette bei -80°C weg. Nach 2 bis 72 h wird der Film entnommen und entwickelt.

2.2.5. Statistik

Die Ergebnisse der Experimente werden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen werden je nach Experiment mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test bzw. der Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) und einem angeschlossenen Bonferroni-Test für mutiple Vergleiche beschrieben. Wenn anstelle des Bonferroni-Tests der LSD-Test angewendet wurde, wird gesondert darauf hingewiesen. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel und Winstat von Microsoft.

3. Ergebnisse

3.1. Molekularer Mechanismus der Gallensäuren-vermittelten Apoptoseinduktion

3.1.1. Gallensäuren induzieren Apoptose

Hydrophobe Gallensäuren wie Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) oder Tauroolithocholsäure (TLCA) induzieren Apoptose in Leberzellen. Untersucht wurde, ob die Aufnahme der Gallensäuren in die Zellen für die Auslösung der Apoptose essentiell ist. Hierfür wurde die humane Hepatomzelllinie HepG2 mit dem Na-abhängigen Gallensäuretransporter Ntcp (*Na-taurocholate-cotransporting protein*) stabil transfiziert. Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit steigenden Konzentrationen an GCDCA (25 – 75 μM) zeigte eine dosisabhängige Apoptoserate, die durch die Bestimmung der Aktivität der Caspasen-3 und -7 quantifiziert wurde (siehe Abbildung 10). HepG2 Zellen ohne Gallensäuretransporter zeigten keine erhöhte Apoptoserate nach Gallensäurenstimulation.

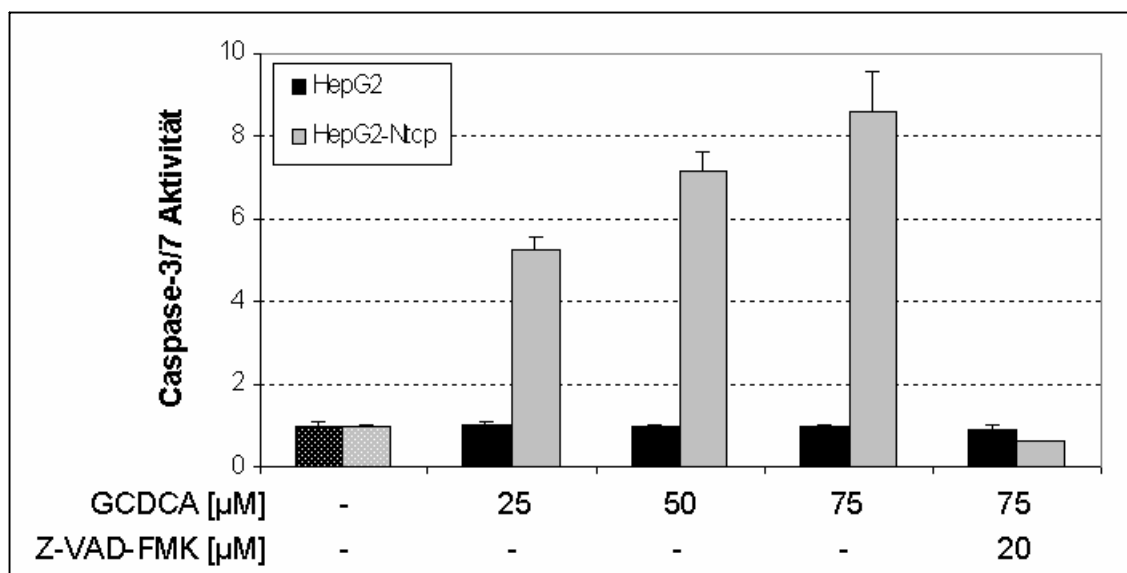


Abbildung 10: GCDCA induziert Apoptose nach Aufnahme in Hepatozyten. HepG2 (schwarz) und HepG2-Ntcp (grau) Zellen wurden 4h mit der angegebenen Konzentration GCDCA stimuliert. Messung der Apoptoserate durch Caspase-3/-7 Aktivitätsassay. Der Pancaspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 μM) zeigt die Spezifität des Assays. HepG2 Zellen zeigten keine Aktivierung der Caspase-3 oder -7, HepG2-Ntcp Zellen hingegen eine konzentrationsabhängige Aktivierung. Die Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert. (MW \pm SD, n=3) (aus Dissertation Kris Bauchmüller, Med.II, Klinikum Großhadern, LMU München)

Die verschiedenen hydrophoben Gallensäuren induzierten unterschiedlich stark Apoptose (siehe Abbildung 11). TLCA-Konzentrationen von 10 μM - 40 μM induzierten nach 4h Inkubationszeit eine sehr hohe Apoptoserate. Niedrigere Konzentrationen (1 μM – 5 μM) zeigten keine Aktivierung der Effektorcaspasen. 20 μM TLCA induzierten mit 75 μM GCDCA vergleichbare Caspase-3 und -7 Aktivitäten.

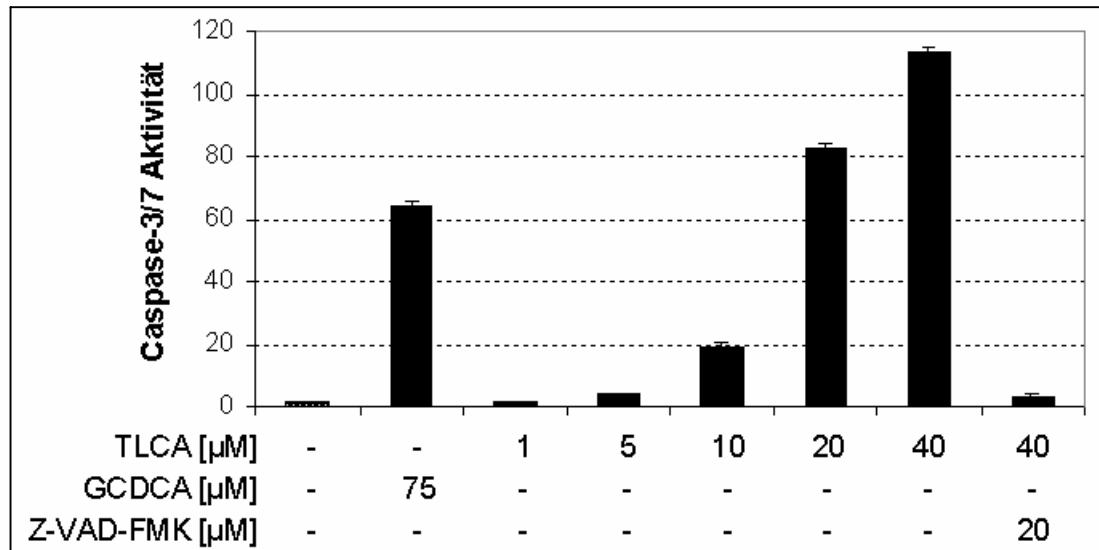


Abbildung 11: Hydrophobe Gallensäuren induzieren Apoptose. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit der angegebenen Konzentration GCDCA bzw. TLCA inkubiert. Messung der Apoptoserate durch Caspase-3/-7 Aktivitätsassay. Der Pancaspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 μM) zeigt Apoptosespezifität des Assays. TLCA wies eine höhere Toxizität bei niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu GCDCA auf. (MW \pm SD, n=3)

Bei der Gallensäuren-induzierten Apoptose werden sowohl die Initiatorcaspasen-8 und -9, als auch die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (siehe Abbildung 12). Die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 erfolgt vor allem durch induzierte Nähe nach Ausbildung des DISC-Komplexes (*death inducing signaling complex*) am Todesrezeptor. Es wurde postuliert, dass Gallensäuren-vermittelte Apoptose über den Fas-Rezeptor unabhängig von Fas-Ligand induziert wird. Das Vorhandensein von aktivierter Caspase-9 zeigt eine Schädigung der Mitochondrien mit Austritt von proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum, da sich nur dann das Apoptosom ausbilden kann und Caspase-9 aktiviert wird. Die aktivierten Initiatorcaspasen-8 oder -9 induzieren die Proteolyse der Effektorcaspasen-3 und -7, die zum Zelluntergang führen.

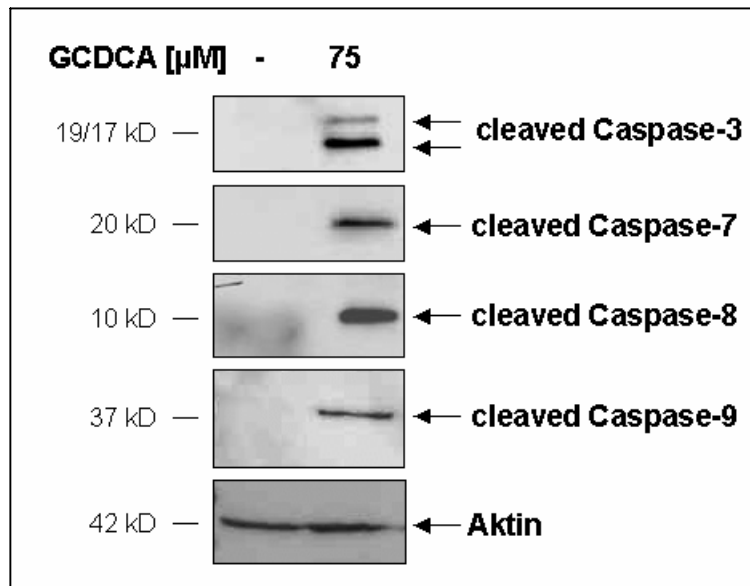


Abbildung 12: GCDCA aktiviert Caspase-3, -7, -8 und -9. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit 75 μ M GCDCA oder Trägermedium (Kontrolle) inkubiert. Western-Blots mit den spezifischen Antikörpern gegen die aktivierten, proteolysierten (*cleaved*) Caspasen zeigten die Aktivierung der Caspasen. Aktin dient als Ladungskontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot.

3.1.2. Gallensäuren-vermittelte Apoptose in Fas-defizienten Zelllinien

Induzieren Gallensäuren nach ihrem Transport in die Zelle durch Aktivierung des Fas-Rezeptors unabhängig von Fas-Ligand Apoptose? Zur Klärung dieser Frage wurden die Fas-defizienten humanen Hepatomzelllinien Hep3B und Huh7 auf ihre Sensitivität gegenüber der Gallensäuren-vermittelten Apoptose untersucht. Hep3B und Huh7 Zellen besitzen Mutationen im Fas-Rezeptor-Gen. Das Gen wird weder transkribiert noch translatiert (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Hep3B Zellen weisen zusätzlich zur Mutation im Fas-Rezeptor-Gen auch Defekte im p53-Gen auf [135].

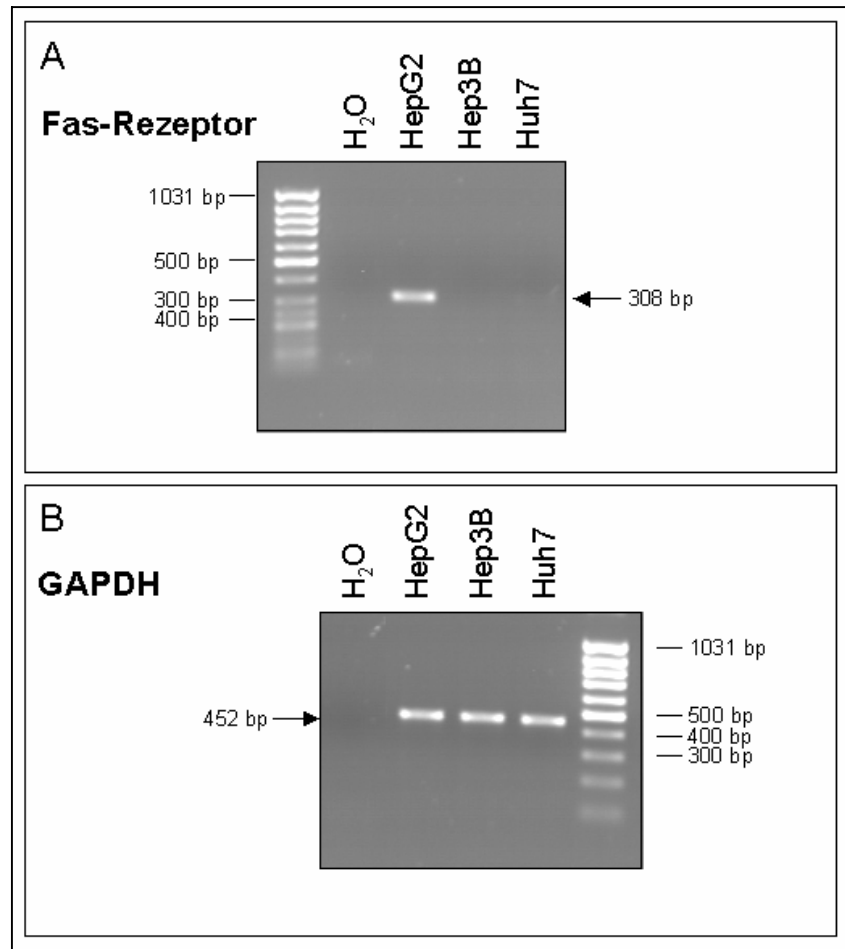


Abbildung 13: Hep3B und Huh7 Zellen synthetisieren keine Fas-Rezeptor mRNA. Gesamt-RNA aus HepG2, Hep3B und Huh7 Zellen wurde in cDNA umgeschrieben. **(A)** PCR mit Primern gegen Fas-Rezeptor. Nur HepG2 Zellen zeigten eine spezifische Bande. **(B)** PCR mit Primern gegen GAPDH. Gleiche Intensität der GAPDH-Banden zeigte äquivalente Quantität und Qualität der cDNAs. H₂O dient als Kontaminationskontrolle.

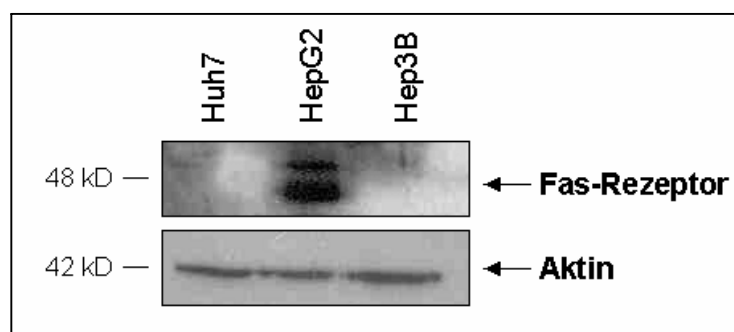


Abbildung 14: Hep3B und Huh7 Zellen exprimieren keinen Fas-Rezeptor. Geamtzelllysate aus Huh7, HepG2 und Hep3B Zellen wurden mittels Western-Blot mit primärem Antikörper gegen Fas-Rezeptor analysiert. Nur HepG2 Zellen wiesen die spezifische Bande auf. Aktin dient als Ladungskontrolle.

Da Gallensäuren nur nach Aufnahme in die Zellen Apoptose auslösen (siehe Abbildung 10), wurden die Huh7 und Hep3B Zellen stabil mit dem Natrium-abhängigen Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert. Die Gallensäureaufnahme wurde über die radioaktiv markierte Gallensäure [^3H]-Taurocholsäure (TCA) bestimmt. Die Aufnahme der Hep3B-Ntcp Zellen schwankte zwischen 1-fach und 18-fach verglichen mit nicht transfizierten Hep3B Zellen. Die Huh7-Ntcp Klone nahmen maximal 6-mal mehr markierte Gallensäure auf als nicht transfizierte Huh7 Zellen. Die Klone Hep3B-Y52 und Huh7-E2 zeigten die größten Aufnahmeeffizienzen und wurden für weitere Experimente verwendet (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

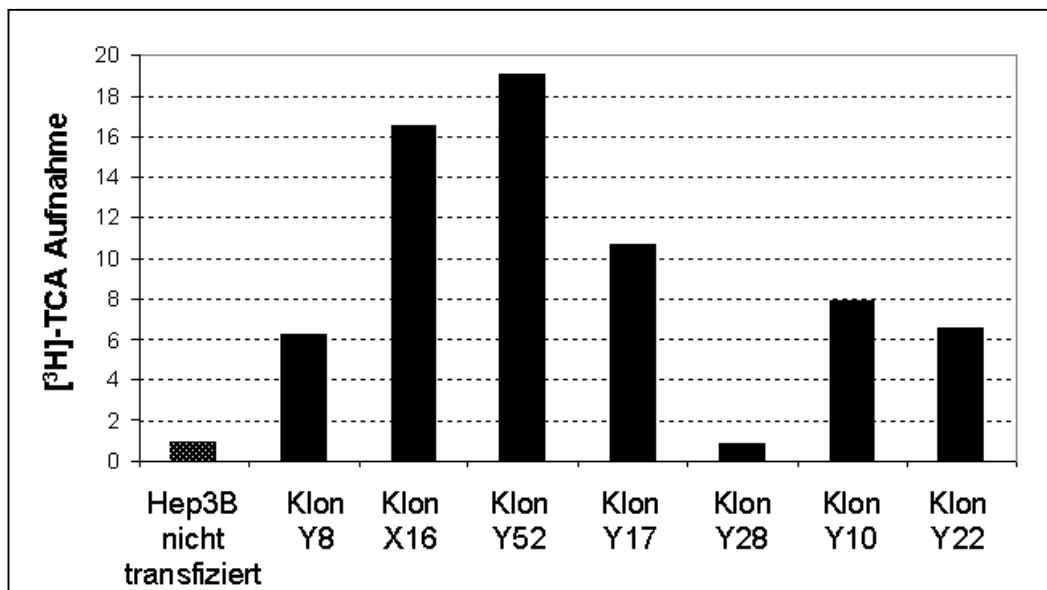


Abbildung 15: [^3H]-TCA Aufnahme der stabilen Hep3B-Ntcp Klone. Die Gallensäureaufnahme von konfluenten Zellen wurde radioaktiv quantifiziert und mit dem Gesamtproteingehalt jeder einzelnen Probe abgeglichen. Die Aufnahme von nicht transfizierten Hep3B Zellen wurde auf 1 normalisiert.

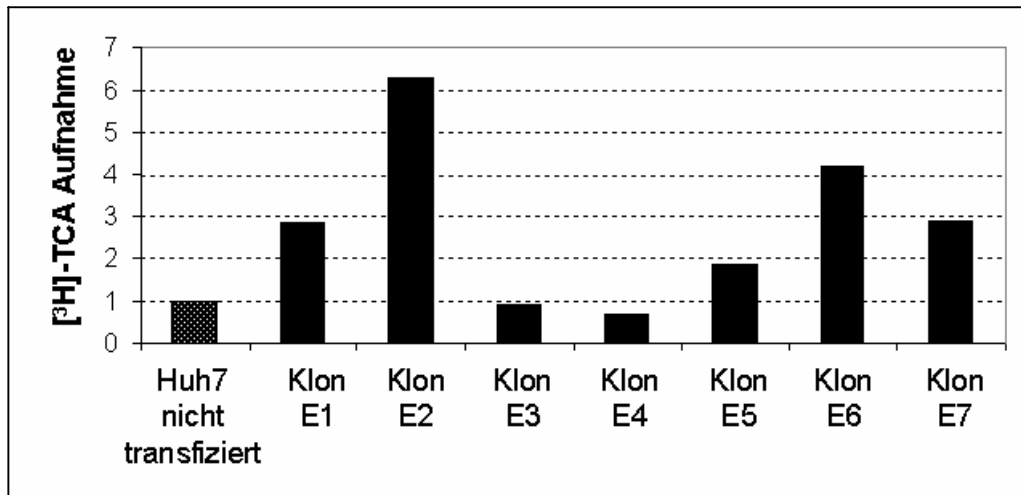


Abbildung 16: [³H]-TCA Aufnahme der stabilen Huh7-Ntcp Klone. Die Gallensäureaufnahme von konfluenten Zellen wurde radioaktiv quantifiziert. Schwankungen in der Zellzahl wurden durch Normalisierung der Aufnahmeeffizienz auf den Gesamtproteingehalt ausgeglichen. Die Aufnahme von nicht transfizierten Huh7 Zellen wurde auf 1 normalisiert.

Zur Klärung der Frage, ob Gallensäuren nach Aufnahme in Fas-defiziente Zellen Apoptose auslösen können, wurden Hep3B-Ntcp und Huh7-Ntcp Zellen mit GCDCA inkubiert. Stimulation des Hep3B-Ntcp-Y52 Klons mit 75 μ M GCDCA oder 75 μ M TLCA für 4h induzierte eine 5- bzw. 9-fach höhere Apoptoserate als in nicht stimulierten Zellen. Hep3B Zellen ohne den Gallensäuretransporter Ntcp reagierten nicht auf Gallensäuren (siehe Abbildung 17).

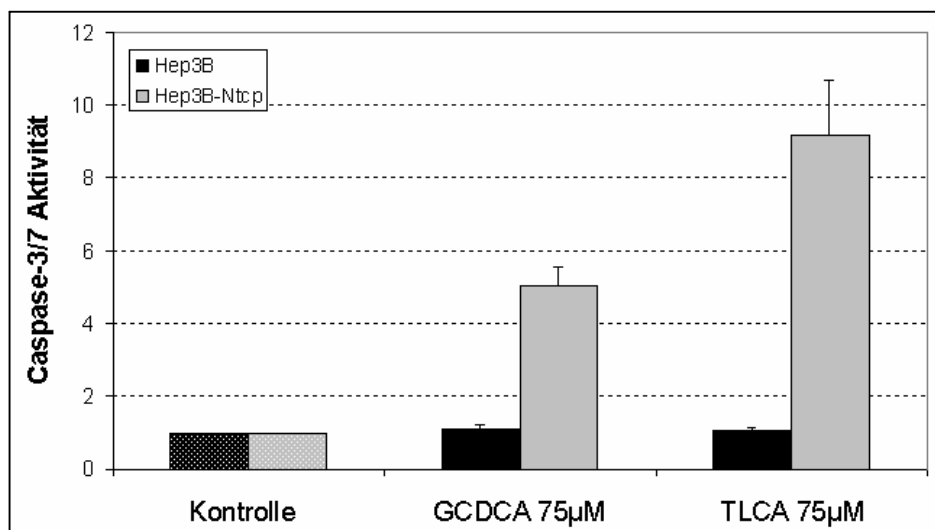


Abbildung 17: Hydrophobe Gallensäuren induzieren Apoptose nach Aufnahme in Hep3B-Ntcp Zellen. Hep3B Zellen (schwarz) und Hep3B-Ntcp Zellen (grau) wurden 4h mit der angegebenen Konzentration GCDCA bzw. TLCA inkubiert. Messung der Apoptoserate durch Caspase-3/-7 Aktivitätsassay. Gallensäuren induzierten in Hep3B Zellen keine Apoptose, nach Aufnahme in Hep3B-Ntcp Zellen wirkten sie apoptotisch. TLCA weist eine höhere Toxizität bei gleicher Konzentration im Vergleich zu GCDCA auf. (MW \pm SD, n=3)

Der Huh7-Ntcp Klon E2 zeigte nach 4h Stimulation mit 75 μ M GCDCA sogar eine 14-fache Erhöhung der Apoptoserate verglichen mit nicht stimulierten Zellen. Die Gallensäure ist auch hier erst nach Aufnahme in die Zellen toxisch; Huh7 Zellen ohne den Gallensäuretransporter induzierten keine Gallensäuren-vermittelte Apoptose (siehe Abbildung 18).

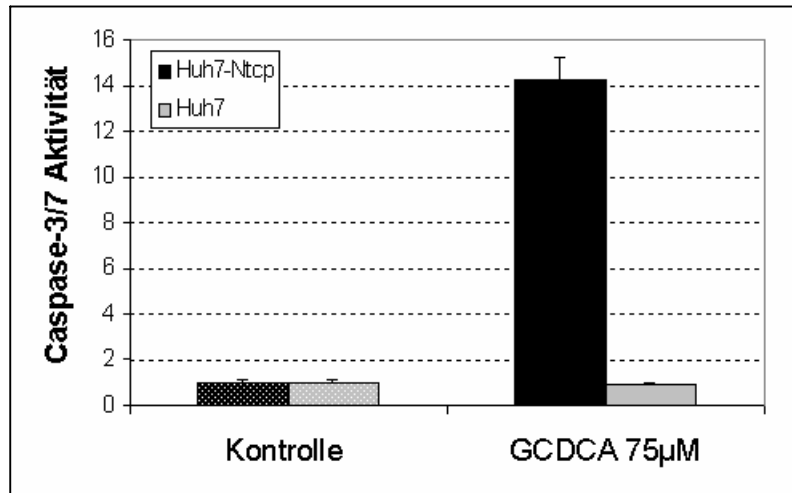


Abbildung 18: GCDCA induziert Apoptose nach Aufnahme in Huh7 Zellen. Huh7 (schwarz) und Huh7-Ntcp (grau) Zellen wurden 4h mit 75 μ M GCDCA oder Trägermedium (Kontrolle) inkubiert. Messung der Apoptoserate durch Caspase-3/-7 Aktivitätsassay. GCDCA induzierte nur in Huh7-Ntcp Zellen Apoptose. (MW \pm SD, n=3)

3.1.3. Inhibierung der Caspase-8 Expression durch siRNA

Nachdem der Fas-Rezeptor nicht essentiell für die Gallensäuren-vermittelte Apoptoseinduktion zu sein scheint, sollte als nächstes untersucht werden, ob Gallensäuren überhaupt Apoptose über Todesrezeptoren auslösen. Hepatozyten besitzen neben Fas eine Vielzahl von unterschiedlichen Todesrezeptoren, wie TNF-R1 (*tumor necrosis factor receptor 1*), TRAIL-R1/DR4 (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1*) und TRAIL-R2/DR5. Die Induktion der Apoptose via Todesrezeptoren erfolgt stets durch Ausbildung des DISC-Komplexes und Aktivierung der Caspase-8. Deshalb wird die Expression der Caspase-8 durch siRNA (*small interfering RNA*), auch RNAi (*RNA interference*) genannt, verhindert. Diese relativ neue Technik erlaubt eine bis zu 90%ige Reduzierung eines spezifischen Proteins, ohne dass andere Proteine in ihrer Expression beeinflusst werden [55, 142]. Obwohl der molekulare Mechanismus der spezifischen Gensuppression durch RNAi noch nicht verstanden ist, wurde diese sehr effiziente und zuverlässige Methode zur spezifischen Geninaktivierung seit ihrer Entdeckung vielfach angewandt.

3.1.3.1. siRNA-Expressionsplasmid pSUPER gegen Caspase-8

Brummelkamp et al. klonierten das siRNA-Expressionsplasmid pSUPER, welches auf dem pBlueskript-KS-Plasmid von Stratagene basiert und zusätzlich einen H1-Promotor enthält [24]. An diesen Promotor bindet die zelluläre RNA-Polymerase III und schreibt die *downstream* gelegene Sequenz ab. Um Caspase-8 zu supprimieren, wurde hinter den Promotor die spezifische Sequenz gegen die mRNA von Caspase-8 gemäß Protokoll kloniert (siehe Abbildung 19) [211]. Die von der eukaryontischen Polymerase III transkribierte RNA-Sequenz ist so konstruiert, dass sich 19 Basen am 5'-Ende mit 19 dazu komplementären Basen am 3'-Ende paaren und sich eine ungepaarte Schleife in der Mitte der Sequenz ausbildet. Diese Struktur wird von der Zelle zu funktionierenden RNAi-Molekülen prozessiert, die wie synthetische dsRNAs funktionieren. Der Vorteil von RNAi-Expressionsplasmiden ist, dass kontinuierlich RNAi-Moleküle produziert werden und sogar stabile Klone hergestellt werden können, bei denen ein Gen spezifisch supprimiert ist. Außerdem entstehen nach der

Klonierung kaum Folgekosten, da das Plasmid einfach in Bakterien vermehrt werden kann.

```

1 ggagttaggc aggttagggg actcggagac tgcgatgggtg ccaggaaagg gtggagcggg
61 ttatattctc ctgcctttta aaaagatgga cttcagcaga aatctttatg atattgggga
121 acaactggac agtgaagatc tggcctccct caagttcctg agcctggact acattccgca
181 aaggaagcaa gaacccatca aggatgcctt gatgttattc cagagactcc aggaaaagag
241 aatgttggag gaaagcaatc tgtccttcct gaaggagctg ctcttccgaa ttaatagact
301 ggatttgctg attacctacc taaacactag aaaggaggag atggaaaagg aacttcagac
361 accaggcagg gctcaaattt ctgcctacag ggcatgctc tatcagattt cagaagaagt
421 gagcagatca gaattgaggt cttttaagtt tcttttgcaa gaggaaatct ccaaatgcaa
481 actggatgat gacatgaacc tgcctggatat tttcatagag atggagaaga gggatcatct
541 gggagaagga aagttggaca tcctgaaaag agtctgtgcc caaatcaaca agagcctgct
601 gaagataatc aacgactatg aagaattcag caaagagaga agcagcagcc ttgaaggaag
661 tcctgatgaa ttttcaaatg gggaggagtt gtgtggggta atgacaatct cggactctcc
721 aagagaacag gatagtgaat cacagacttt ggacaaaag tttaccaaata aaagcaaacc
781 tcggggatc tgtctgatca tcaacaatca caattttgca aaagcacggg agaaagtgcc
841 caaacttcac agcattaggg acaggaatgg aacacacttg gatgcaggta cagtagaacc
901 caaaagagaa aagtaaaata tttcttatgc ctattttttt ttaaatcaaa agggagagaa
961 caaaagctat accaaaaggg ccatgtttca agaaaatgga ttaaacata tttccctgtg
1021 gaggggcttt gaccacgacc tttgaagagc ttcattttga gatcaagccc cacgatgact
1081 gcacagtaga gcaaatctat gagattttga aaatctacca actcatggac cacagtaaca
1141 tggactgctt catctgctgt atcctctccc atggagacaa aggcacatc tatggcactg
1201 atggacagga ggccccatc tatgagctga catctcagtt cactggtttg aagtgcctt
1261 cccttgctgg aaaacccaaa gtgtttttta ttcaggcttg tcagggggat aactaccaga
1321 aagggtatac c t gttgagact gattcagagg agcaacccta ttagaaatg gatttatcat
1381 cacctcaaac gagatataat ccggatgagg ctgactttct gctggggatg gccactgtga
1441 ataactgtgt ttcctaccga aaccctgcag agggaacctg gtacatccag tcaacttgcc
1501 agagcctgag agagcgatgt cctcgaggcg atgatattct caccatcctg actgaagtga
1561 actatgaagt aagcaacaag gatgacaaga aaaacatggg gaaacagatg cctcagccta
1621 ctttcacact aagaaaaaaaa cttgtcttcc cttctgattg atggtgctat tttgtttgtt
1681 ttgttttggt ttgttttttt gagacagaat ctcgctctgt cgc

```

Abbildung 19: cDNA-Sequenz von Caspase-8. Basen 154 – 172 (rot markiert) zeigen die spezifische Sequenz, die zur Klonierung in den pSUPER-Vektor verwendet wurde. Sequenz aus [211] entnommen.

Die Transfektion der HepG2-Ntcp Zellen mit dem pSUPER-Konstrukt gegen Caspase-8 zeigte allerdings keine Reduktion des Caspase-8 Proteingehaltes. Zu keinem Zeitpunkt zwischen dem ersten und dem achten Tag nach der Transfektion wurde die Expression der Caspase-8 unterdrückt (siehe Abbildung 20).

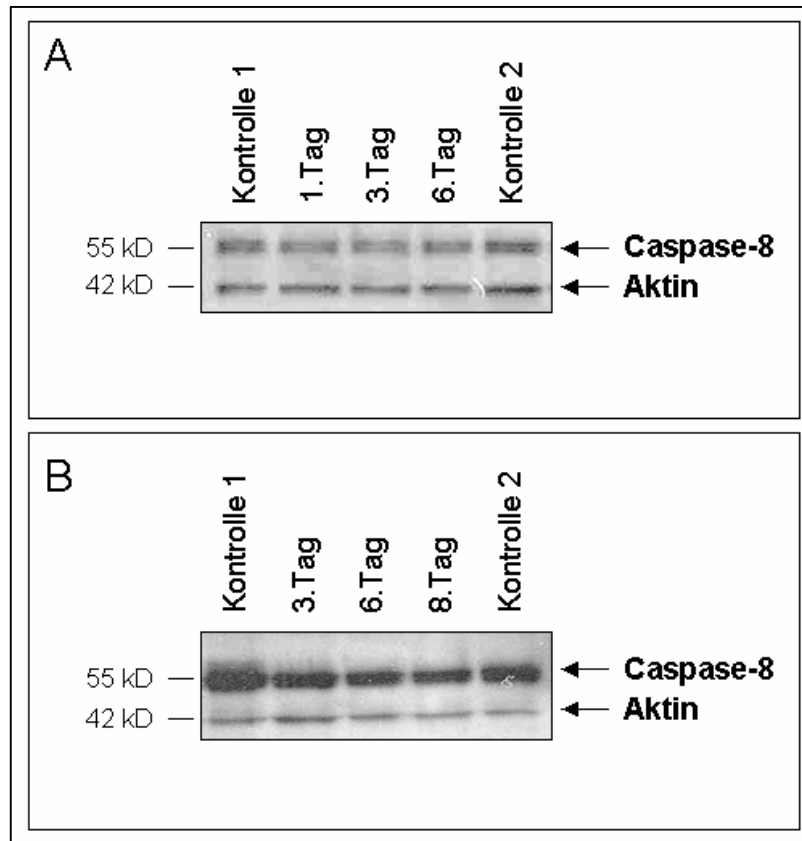


Abbildung 20: pSUPER gegen Caspase-8 zeigt keine Reduktion des Proteingehaltes. (A+B) HepG2-Ntcp Zellen wurden mit dem pSUPER-Plasmid gegen Caspase-8 transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Der Western-Blot mit primärem Antikörper gegen Caspase-8 zeigt keine Reduktion des Caspase-8 Proteinlevels. Aktin dient als Ladungskontrolle. Kontrolle 1 sind Zellen, die mit dem pSUPER-Konstrukt gegen Proteinkinase C- α transfiziert wurden; Kontrolle 2 sind nicht transfizierte Zellen.

Um ausschließen zu können, dass eine geringe Transfektionseffizienz oder die Zelllinie für das Versagen des Konstruktes verantwortlich sind, wurde das Experiment an weiteren Zelllinien, die sich sehr gut transfizieren lassen, wiederholt (siehe Abbildung 21). In Abbildung 21 erkennt man eine leichte Reduktion bei Hela-Zellen (A) am dritten Tag nach der Transfektion.

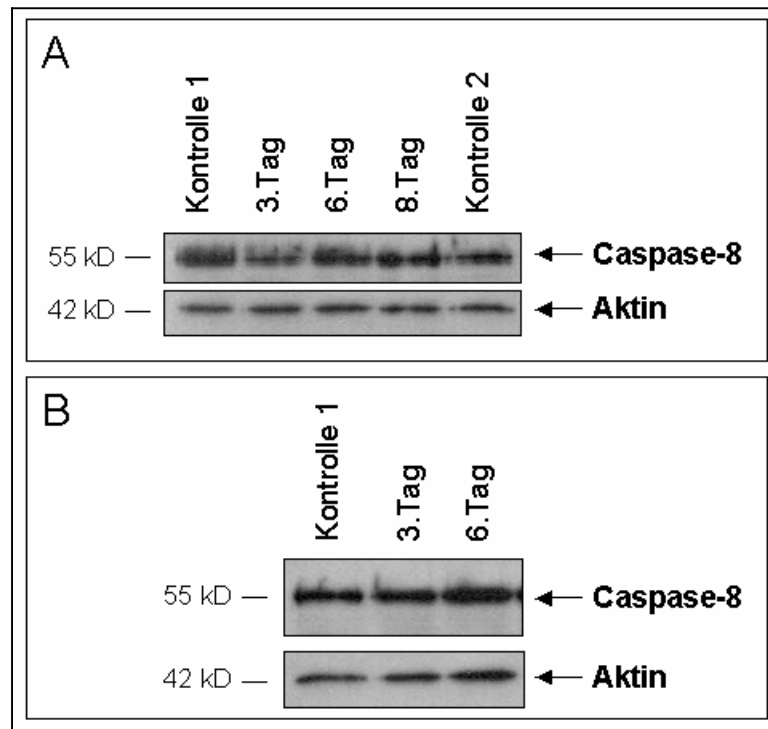


Abbildung 21: pSUPER gegen Caspase-8 zeigt keine eindeutige Reduktion der Expression in HeLa und Cos Zellen. (A) HeLa-Zellen und (B) Cos-Zellen wurden mit dem pSUPER-Plasmid gegen Caspase-8 transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Der Western-Blot mit primärem Antikörper gegen Caspase-8 zeigt nur 72h nach der Transfektion eine schwache Reduktion des Caspase-8 Proteinlevels bei HeLa-Zellen. Aktin dient als Ladungskontrolle. Kontrolle 1 sind nicht transfizierte Zellen; Kontrolle 2 sind Zellen, die mit dem pSUPER-Konstrukt gegen Proteinkinase C- α transfiziert wurden.

Da transiente Transfektionen zu keiner Reduktion der Caspase-8 in HepG2-Ntcp Zellen führten, wurde die Kasette, bestehend aus dem H1-Promotor und der RNAi-Sequenz gegen Caspase-8, in den pcDNA3.1 Vektor, der zusätzlich eine Resistenz gegen Puromycin enthält, kloniert. Dieses Plasmid pSUPER-Caspase-8-Puromycin wurde verwendet, um HepG2-Ntcp-Zellen stabil zu transfizieren. Die stabilen Zellklone wurden durch Western-Blot mit primärem Antikörper gegen Caspase-8 auf eine Reduktion des Proteinlevels überprüft. Sie zeigten ebenfalls keine bzw. nur eine schwache Reduktion um maximal 20% bei Klon 2 (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

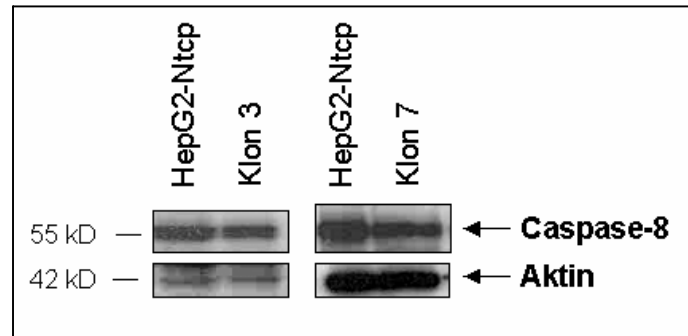


Abbildung 22: Keine Reduktion des Caspase-8 Proteingehaltes in den stabilen pSUPER-Caspase-8-Puromycin Klonen. Stabile Transfektion mit dem pSUPER-Caspase-8-Puromycin Plasmid. Die Klone 3 und 7 zeigen keine Reduktion des Proteingehaltes an Caspase-8 im Western-Blot gegen Caspase-8. Aktin dient als Ladungskontrolle.

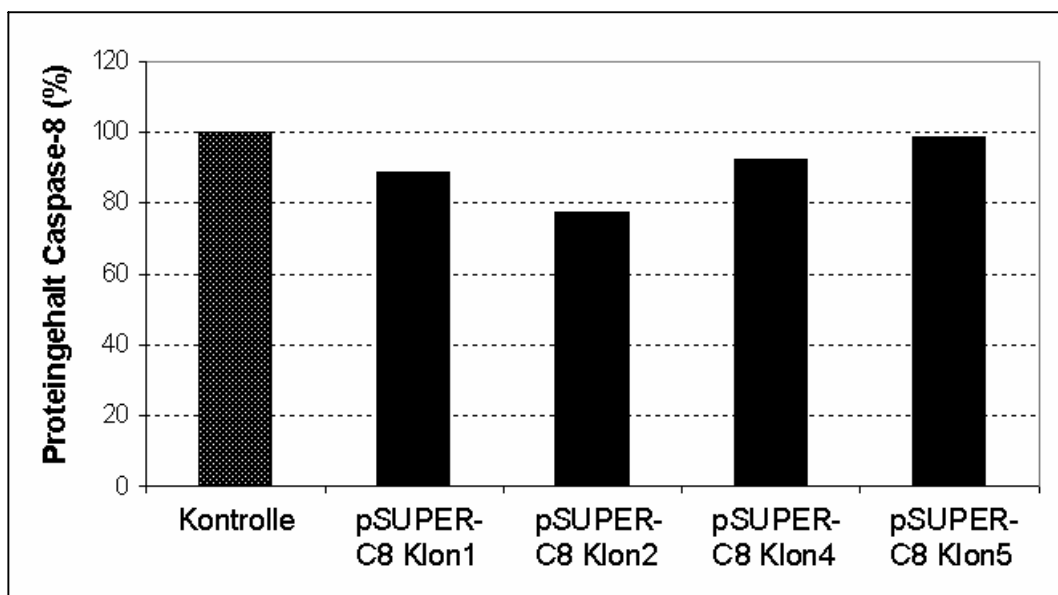


Abbildung 23: Proteingehalt von Caspase-8 in weiteren stabilen pSUPER-Caspase-8-Puromycin Klonen. Stabile Transfektion mit dem pSUPER-Caspase-8-Puromycin Plasmid. Densitometrische Auswertung von Western-Blots gegen Caspase-8. Schwankungen im Gesamtproteingehalt wurden durch densitometrische Auswertung der Aktin-Ladungskontrolle und Normierung des Caspase-8 Proteingehaltes auf den Gesamtproteingehalt ausgeglichen. Normierung des Caspase-8 Proteingehaltes der Kontrolle (nicht transfizierte HepG2-Ntcp Zellen) auf 100%.

Für weiterführende Experimente eignet sich somit das pSUPER-Caspase-8 Konstrukt weder in transienten noch in stabilen Transfektionen. Wahrscheinlich ist die ausgewählte Sequenz für das siRNA-Expressionsplasmid nicht geeignet, obwohl sie in einem adenoviralen siRNA-Expressionsvektor mit U6-Promotor eine gute Reduktion in Hela-S3 Zellen aufwies [211].

3.1.3.2. synthetische siRNAs gegen Caspase-8

Synthetische siRNAs bestehen aus doppelsträngigen RNAs (dsRNA) mit 21 Nukleotiden. Da auch hier die Sequenz entscheidend für die Effizienz der Reduktion ist, wurden getestete RNAi-Moleküle gegen Caspase-8 von der Firma Dharmacon (Chicago, USA) bezogen. Die siRNA besteht hierbei immer aus einer Mischung von dsRNA-Molekülen mit vier unterschiedlichen Sequenzen. Die Transfektion mit den synthetischen RNAis in Konzentrationen von 10nM oder 50nM reduzierten den Proteingehalt der Caspase-8 am dritten Tag nach der Transfektion deutlich (siehe Abbildung 24).

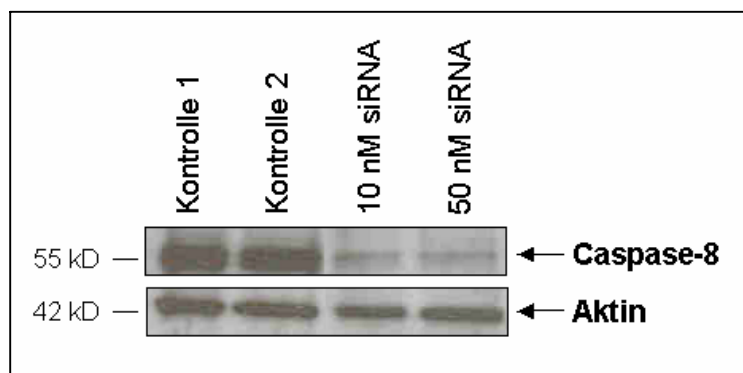


Abbildung 24: Transiente Transfektion mit 10nM und 50nM siRNA gegen Caspase-8 reduzieren den Proteingehalt effizient. 72h nach Transfektion der HepG2-Ntcp Zellen mit 10nM und 50nM siRNA gegen Caspase-8 ist der endogene Gehalt der Caspase-8 im Western Blot deutlich reduziert. Kontrolle 1 sind nicht transfizierte HepG2-Ntcp Zellen; Kontrolle 2 sind scheintransfizierte Zellen, d.h. sie sind mit Oligofectamine ohne Zugabe von siRNA transfiziert worden. Aktin dient als Ladungskontrolle.

Eine Zeitkinetik mit 10nM siRNA zeigte, dass der endogene Gehalt von Caspase-8 bereits 72h nach der Transfektion reduziert ist und über 144h auf einem niedrigen Niveau bleibt (siehe Abbildung 25). Selbst das Ablösen der Zellen mit Trypsin 24h nach der Transfektion und erneutes Aussäen beeinflusste die Effizienz der Reduktion nicht (siehe Abbildung 25; Probe 72h S).

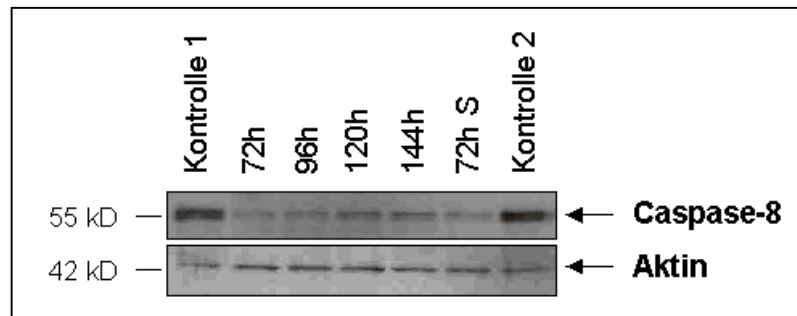


Abbildung 25: Zeitkinetik einer Transfektion mit 10nM siRNA gegen Caspase-8. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 10nM siRNA gegen Caspase-8 transfiziert. Zu den angegebenen Zeiten nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Reduktion des endogenen Caspase-8 Gehaltes ist 72h nach Transfektion erkennbar. Splitten der Zellen 24h nach der Transfektion, d.h. Ablösen mittels 1xTrypsin-EDTA und erneutes Aussäen, wirkt sich nicht auf die Gensuppression aus (72h S). Kontrolle 1 sind nicht transfizierte Zellen; Kontrolle 2 ohne Zugabe von siRNA transfizierte Zellen. Inkubation des Western-Blots mit Aktin-Antikörper dient als Ladungskontrolle.

Da eine hohe lokale Konzentration von Caspase-8-Molekülen am DISC-Komplex vorherrschen muss, damit die Caspase-8 aktiviert wird, können HepG2-Ntcp Zellen, die durch siRNA einen stark reduzierten Proteingehalt an Caspase-8 enthalten, nur noch bedingt Apoptose über die Todesrezeptoren auslösen. 24h nach Transfektion mit siRNA gegen Caspase-8 oder GFP als Kontrolle wurden die HepG2-Ntcp Zellen abgelöst. Alle Zellen, die mit der gleichen siRNA transfiziert worden sind, wurden vereinigt und für Western-Blots und Caspase-3/-7 Aktivitätsassay ausgesät (Abbildung 26 und Abbildung 27). 72h nach der Transfektion wurden nicht transfizierte, mit siRNA gegen GFP oder gegen Caspase-8 transfizierte Zellen mit 75 μ M GCDCA bzw. 50 ng/ml TNF- α und 0,2 μ g/ml Actinomycin D oder Trägermedium (Kontrolle) für 4h inkubiert. Der Caspase-8 Western-Blot in Abbildung 26 zeigt die eindeutige Reduktion des Proteingehalts durch die siRNA gegen Caspase-8. siRNA gegen GFP veränderte den Caspase-8 Proteingehalt verglichen mit untransfizierten Zellen nicht. Die Analyse der Gesamtzelllysate auf Präsenz der aktivierten (cleaved) Caspasen durch Western-Blot zeigt sehr eindrucksvoll, dass nur die stimulierten Proben aktive Caspasen aufweisen. Sowohl GCDCA als auch TNF- α aktivierten in nicht transfizierten und Kontroll-transfizierten (siRNA GFP) Zellen die Caspasen-8, -9, -3 und -7. Ausschalten der Caspase-8 durch siRNA hemmte nach GCDCA-Stimulation nur die Aktivierung der Caspase-8. Die Banden der aktivierten Formen der Caspase-9, -3 und -7 waren kaum verändert. Anders nach Apoptoseinduktion mit TNF- α und Actinomycin D: TNF- α bindet an den Todesrezeptor TNF- α R1 und löst

ausschließlich über diesen Apoptose aus, wobei das Apoptosesignal in Typ-II-Zellen, wie Hepatozyten, zusätzlich über die Mitochondrien verstärkt wird. Verringerung des Caspase-8 Gehaltes verminderte nach TNF- α Stimulation die Aktivierung der Caspase-8 und zusätzlich aller anderen Caspasen (siehe Abbildung 26).

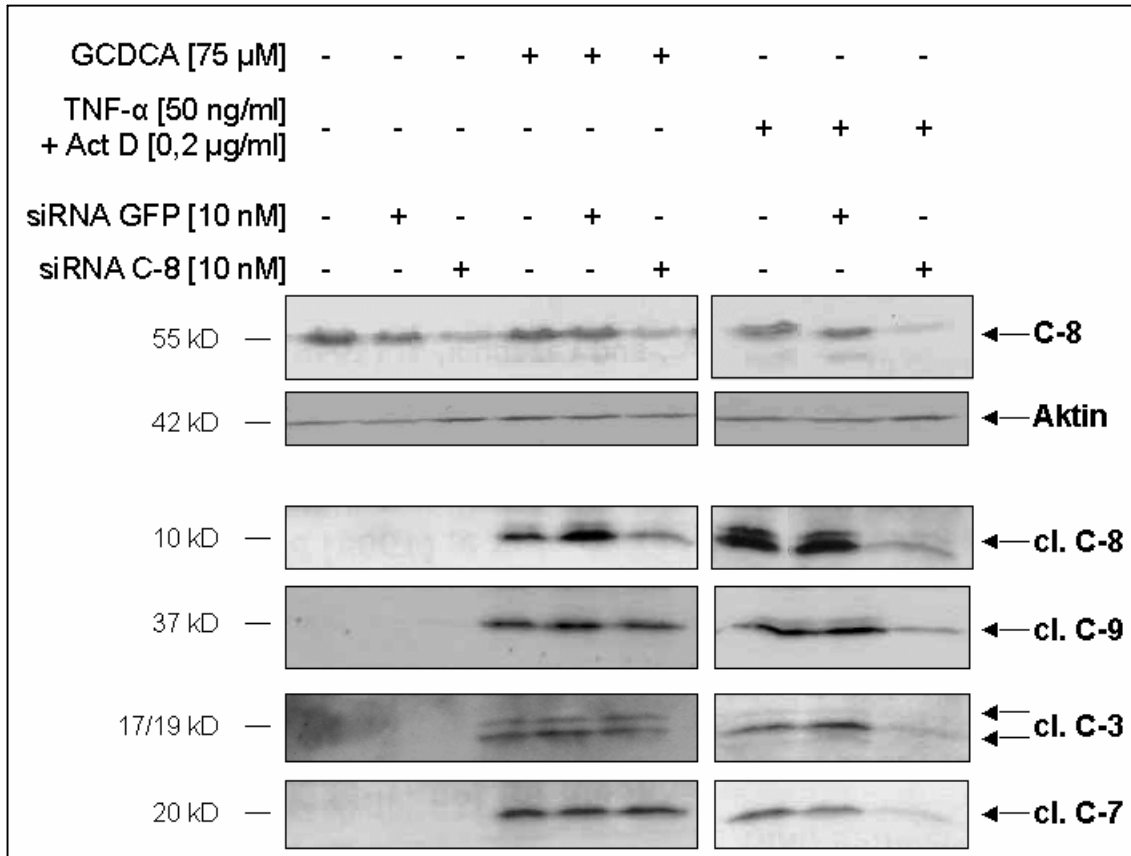


Abbildung 26: Knockout der Caspase-8 in HepG2-Ntcp Zellen verhindert die GCDCA-induzierte Apoptose nicht. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 10nM siRNA gegen GFP (Kontrolle) und Caspase-8 (C-8) oder nicht transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und neu ausgesät. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen 4h mit 75 μ M GCDCA bzw. 50 ng/ml TNF- α und 0,2 μ g/ml Actinomycin D (Act D) oder Trägermedium (Kontrolle) inkubiert. Western-Blot mit Gesamtzelllysaten und primärem Antikörper gegen Caspase-8 (C-8) zeigen die Reduktion des Caspase-8 Proteingehaltes durch siRNA gegen Caspase-8. Aktin dient als Ladungskontrolle. Aktivitäten der Caspase-8 (cl. C-8), -9 (cl.C-9), -3 (cl. C-3) und -7 (cl. C-7) werden durch Western-Blots aus Gesamtzelllysaten mit den jeweiligen primären Antikörpern gegen die cleaved Caspasen gezeigt.

Die Quantifizierung der Apoptoserate 72h nach der Transfektion mit siRNA gegen GFP oder Caspase-8 erfolgte durch Caspase-3/-7 Aktivitätsassay. Dabei wurden die HepG2-Ntcp Zellen mit 75 μ M GCDCA oder 50 ng/ml TNF- α und 0,2 μ g/ml Actinomycin D für 4h inkubiert. Auch hier ist nur ein geringer Rückgang der GCDCA-induzierten Apoptoserate um 26% nach Reduktion des Caspase-8 Levels zu sehen,

wohingegen die TNF- α -vermittelte Apoptoserate um 79% stark reduziert ist (siehe Abbildung 27).

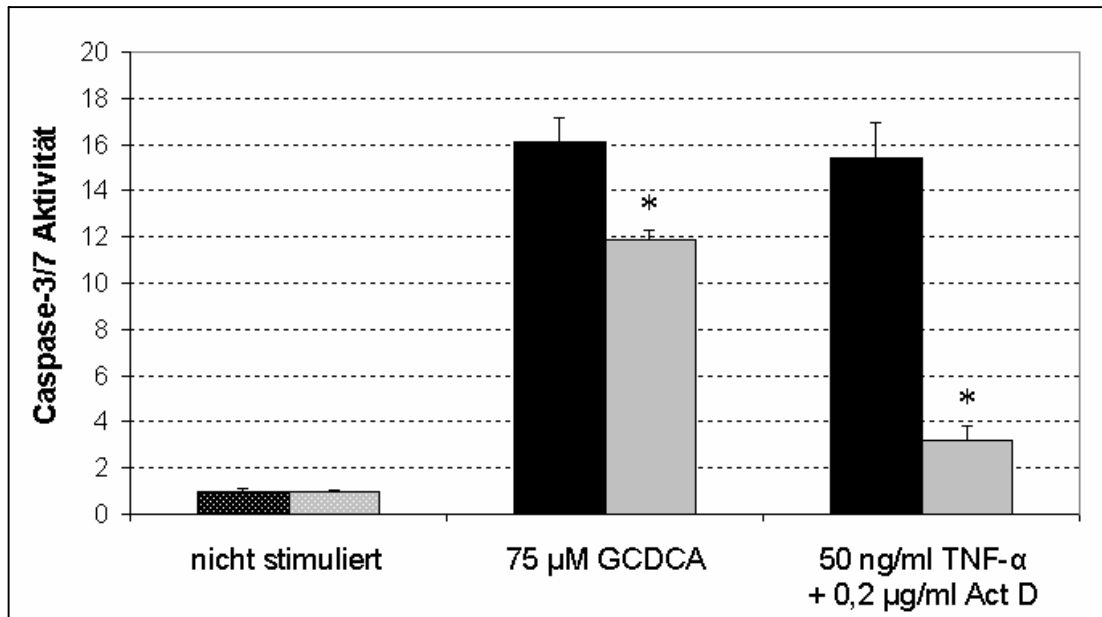


Abbildung 27: Caspase-3/7 Aktivität nach Apoptoseinduktion in Caspase-8-defizienten HepG2-Ntcp Zellen. 72h nach Transfektion mit 10nM siRNA gegen GFP (schwarz) oder Caspase-8 (grau) wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 4h mit 75 μ M GCDCA bzw. 50 ng/ml TNF- α und 0,2 μ g/ml Actinomycin D (Act D) inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/-7 Aktivitätsassay. siRNA gegen Caspase-8 reduziert die Apoptoseinduktion durch TNF- α und Act D deutlich, die GCDCA-vermittelte Apoptose kaum. (MW \pm SD, n=3, p< 0,05 vgl. siRNA GFP)

3.1.4. Blockierung der Caspase-8 mit dem spezifischen Inhibitor Z-IETD-FMK

Eine weitere Möglichkeit zu überprüfen, ob HepG2-Ntcp Zellen Todesrezeptor-unabhängig Apoptose nach Gallensäuren-Stimulation induzieren können, ist der Einsatz eines spezifischen Inhibitors gegen Caspase-8. Der Inhibitor Z-IETD-FMK besitzt die Eigenschaft, über die Aminosäuren Isoleucin (I), Glutaminsäure (E), Threonin (T) und Asparaginsäure (D) direkt im katalytischen Zentrum der Caspase-8 zu binden. Die Fluoromethylketon-Gruppe (FMK) modifiziert die Thiol-Gruppen im katalytischen Zentrum, so dass die Caspase-8 irreversibel gehemmt wird. Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z) macht das Inhibitor-Molekül zellpermeabel.

Inkubation der HepG2-Ntcp-Zellen mit 75 μ M GCDCA zeigte eine deutliche Aktivierung der Caspasen-8, -9 und -3 verglichen mit unstimulierten Zellen. Gleichzeitige Zugabe des Caspase-8 spezifischen Inhibitors Z-IETD-FMK in

Konzentrationen von 20 μM – 100 μM zeigte eine komplette Inhibierung der Caspase-8 ohne vergleichbare Beeinflussung der Caspase-9 (siehe Abbildung 28). Bei Caspase-3 verschwand die untere Bande der Doppelbande durch Zugabe des Inhibitors Z-IETD-FMK; die obere wurde mit 20 μM Inhibitor stärker und mit steigender Konzentration IETD schwächer. Beide Banden entsprechen der prozessierten großen Untereinheit der Caspase-3. Die untere Bande (17 kD) entsteht vor allem nach Proteolyse durch Caspase-8 oder -10 und Autoprozessierung [129]. Die obere Bande (19 kD) repräsentiert die große Untereinheit der Caspase-3, insbesondere nach Aktivierung durch andere Caspasen als Caspase-8 oder -10. Die Caspase-3 Moleküle spalten sich selbst unter Ausbildung des 17 kD großen Fragments vor allem nach Proteolyse durch Caspase-8 oder -10 [197]. Höhere Konzentrationen (50 μM oder 100 μM) Z-IETD-FMK können unspezifisch andere Caspasen hemmen. Deshalb sollte der Caspase-8 spezifische Inhibitor in der geringsten wirksamen Konzentration eingesetzt werden.

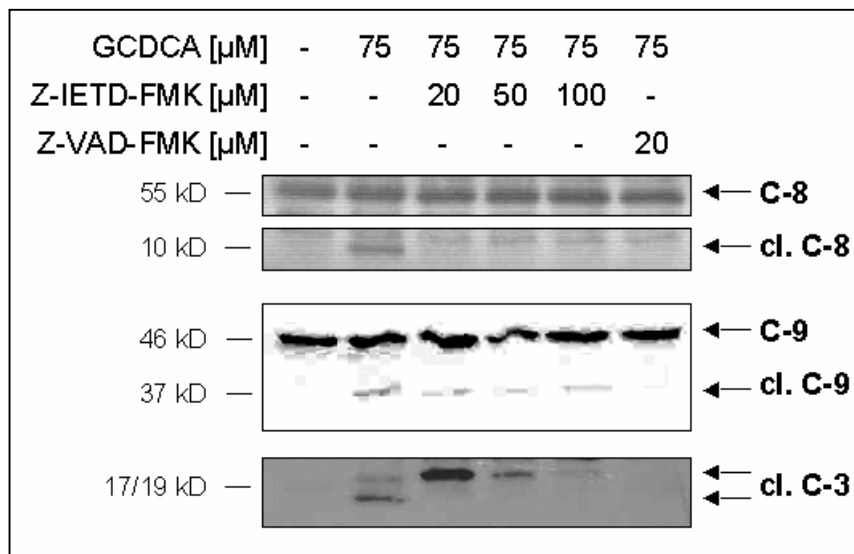


Abbildung 28: Z-IETD-FMK (20 - 100 μM) inhibiert Caspase-8. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle), mit GCDCA (75 μM) allein oder zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen Z-IETD-FMK (20 μM – 100 μM) inkubiert. Der Pancaspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 μM) zeigt Inhibierung aller Caspasen. Western-Blots mit spezifischen Antikörpern gegen aktivierte (cleaved) Caspase-8 (cl. C-8), -9 (cl. C-9) und -3 (cl. C-3) zeigen Aktivität der jeweiligen Caspase. Banden gegen unprozessierte Caspase-8 (C-8) bzw. -9 (C-9) zeigen äquivalente Ladung der Western-Blots.

Versuche mit niedrigeren Konzentrationen Z-IETD-FMK zeigten, dass 1 μM und 10 μM Z-IETD-FMK Caspase-8 zwar hemmen, aber noch aktivierte Caspase-8 nachzuweisen ist (siehe Abbildung 29). Des Weiteren ist bei Konzentrationen unter

20 μM Z-IETD-FMK auch noch durch Caspase-8 prozessierte Caspase-3 zu detektieren (17 kD Bande).

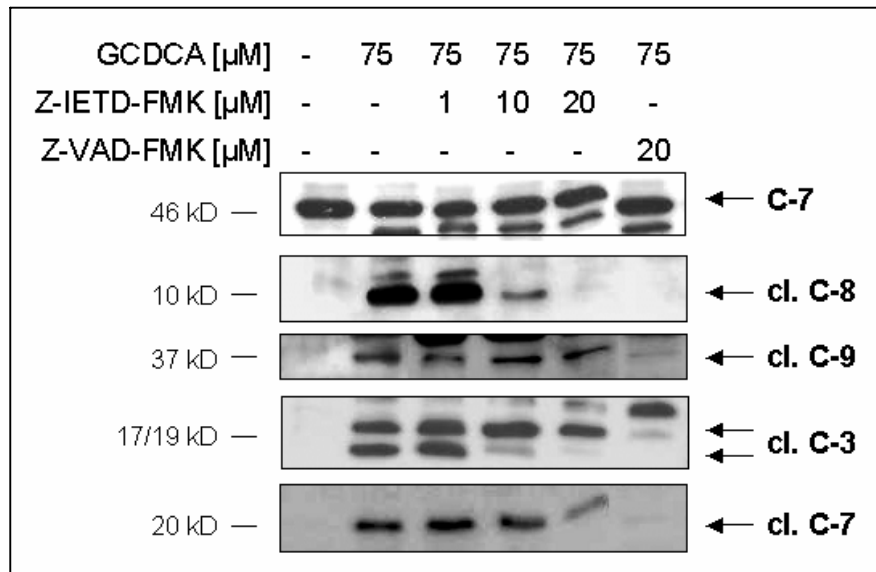


Abbildung 29: Niedrige Konzentrationen Z-IETD-FMK inhibieren Caspase-8 nicht. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h nicht stimuliert, mit GCDCA (75 μM) allein oder zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen Z-IETD-FMK (1 μM – 20 μM) inkubiert. Der Pancaspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 μM) zeigt Inhibierung aller Caspasen. Western-Blots mit spezifischen Antikörpern gegen cleaved Caspase-8, -9, -3 und -7 zeigen Aktivität der jeweiligen Caspase. Banden gegen unprozessierte Caspase-7 zeigen äquivalente Ladung der Western-Blots.

Aus Abbildung 28 und Abbildung 29 ist ersichtlich, dass die Initiatorcaspase-9 unabhängig von Caspase-8 aktiviert wurde, da sie nur durch den Pancaspaseinhibitor Z-VAD-FMK blockiert wird. Die Aktivitäten der Effektorcaspasen-3 und -7 wurden durch Ausschalten der Caspase-8 mit 20 μM IETD nur gering beeinflusst. Die kleinere Bande der aktivierten Caspase-3 Doppelbande verschwand. Aktivierte Caspase-3 war aber weiterhin im Lysat vorhanden.

Die humane Hepatomzelllinie HepG2-Ntcp kann somit unabhängig von Caspase-8 nach Aufnahme hydrophober Gallensäuren Apoptose induzieren.

3.2. Transkriptionelle Modulation während der Gallensäuren-induzierten Apoptose

3.2.1. Einfluss von Sulfasalazin auf die GCDCA-vermittelte Apoptose

Die Gallensäuren-vermittelte Apoptose kann in Hepatozyten durch NF- κ B-abhängige Überlebenswege blockiert werden. Die Aktivität von NF- κ B wird in unterschiedlichen Zelllinien durch Sulfasalazin moduliert.

3.2.1.1. Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-vermittelte Apoptose

Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-vermittelte Apoptose dosisabhängig. In HepG2-Ntcp Zellen zeigte eine 4h Inkubation mit 75 μ M GCDCA eine starke Aktivierung der Caspasen-3 und -7. Gleichzeitige Stimulation mit 1 μ M Sulfasalazin (SSZ) beeinflusste die Apoptoserate nicht. Zugabe von 10 μ M, 100 μ M und 1000 μ M SSZ reduzierte die Caspase-3/7 Aktivität verglichen mit 75 μ M GCDCA stimulierten Zellen um 22 %, 86 % und 97 % (siehe Abbildung 30).

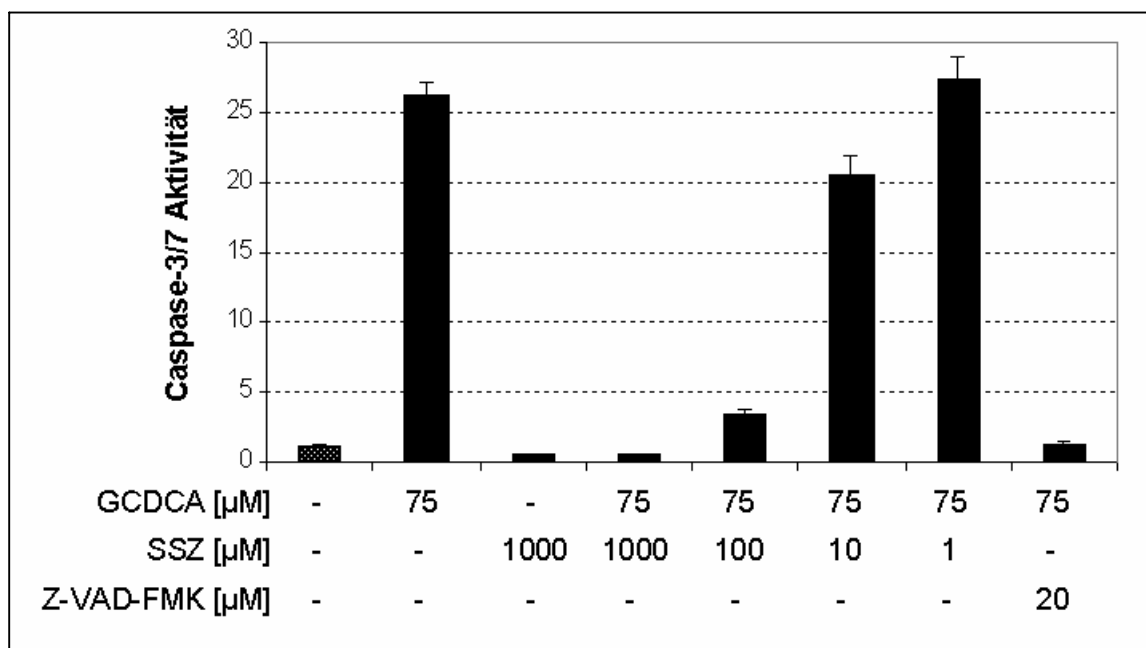


Abbildung 30: Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-induzierte Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen dosisabhängig. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μ M GCDCA allein bzw. zusammen mit der angegebenen Konzentration Sulfasalazin (SSZ) inkubiert. Die Apoptoserate wurde durch Messung der Caspase-3/7 Aktivität bestimmt. Die Caspase-3/7 Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert. (MW \pm SD, n=3) (aus Dissertation Kris Bauchmüller, Med.II, Klinikum Großhadern, LMU München)

Analyse von subkonfluenten HepG2-Ntcp Zellen nach 4h Inkubation mit 75 μM GCDC in Ab- und Anwesenheit von 100 μM bzw. 1000 μM SSZ mittels Immunocytoologie gegen aktive Caspase-3 zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Apoptose durch Sulfasalazin (SSZ) (siehe Abbildung 31).

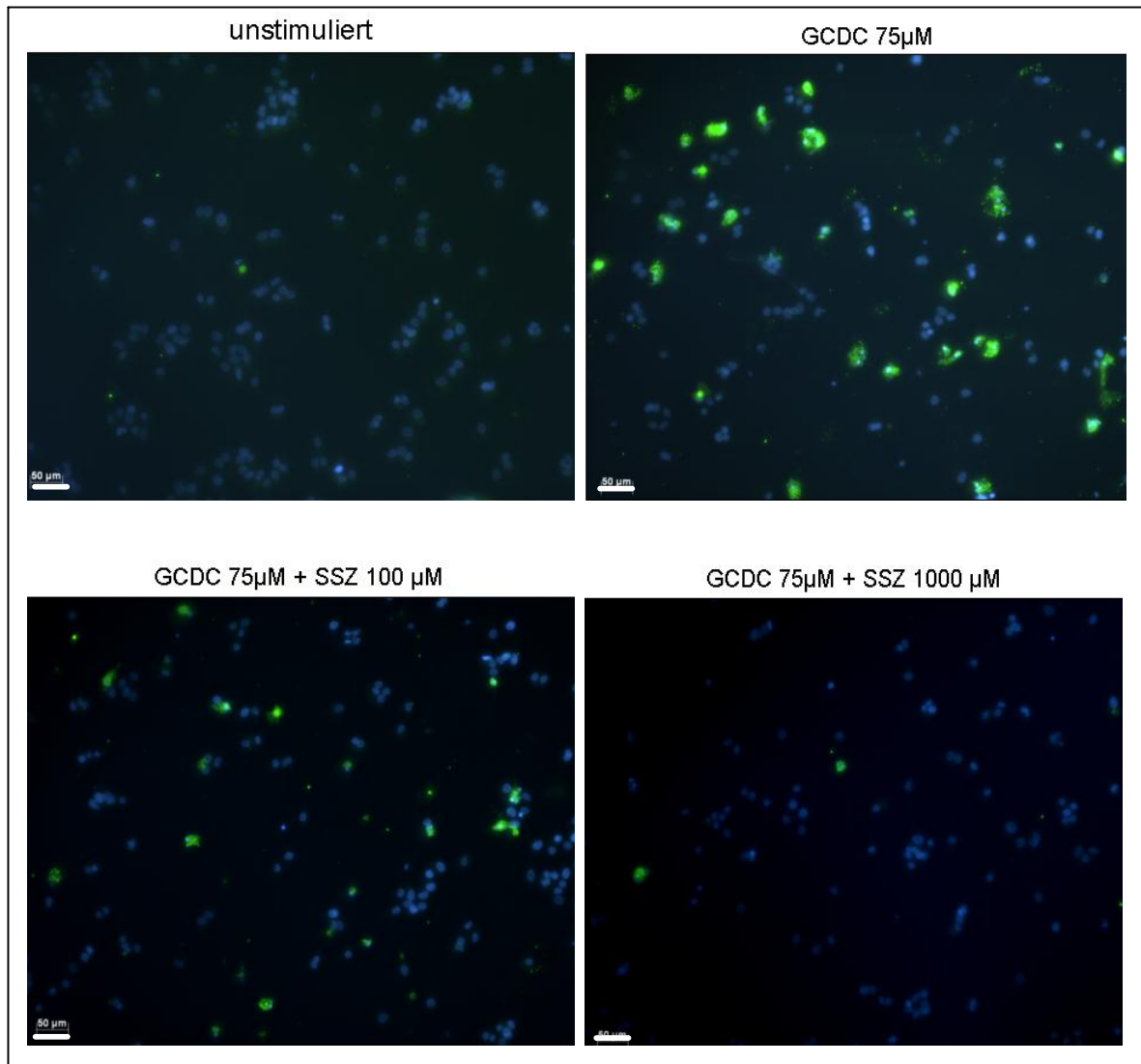


Abbildung 31: Immunocytoologie mit cleaved Caspase-3 Antikörper zeigt Inhibierung der Apoptose durch Sulfasalazin. Subkonfluente HepG2-Ntcp Zellen wurden wie angegeben für 4h stimuliert. Anschließend erfolgte Fixierung und Immunocytoologie mit primärem Antikörper gegen aktive Caspase-3. Detektion der cleaved Caspase-3 markierten Zellen mit sekundärem FITC-markierten Antikörper (grün). Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Weißer Balken unten links entspricht 50 μm (100-fache Vergrößerung).

Auszählung von ungefähr 800 Zellen, d.h. DAPI-gefärbten Zellkernen, durch 3 unabhängige Untersucher ergab eine Apoptoserate von 25% bei mit 75 μM GCDCA stimulierten Zellen. Zugabe von 100 μM SSZ reduzierte die für aktivierte Caspase-3 positiven Hepatozyten um $52 \pm 4\%$, die simultane Inkubation mit 1000 μM SSZ sogar um $90 \pm 3\%$ (siehe Abbildung 32).

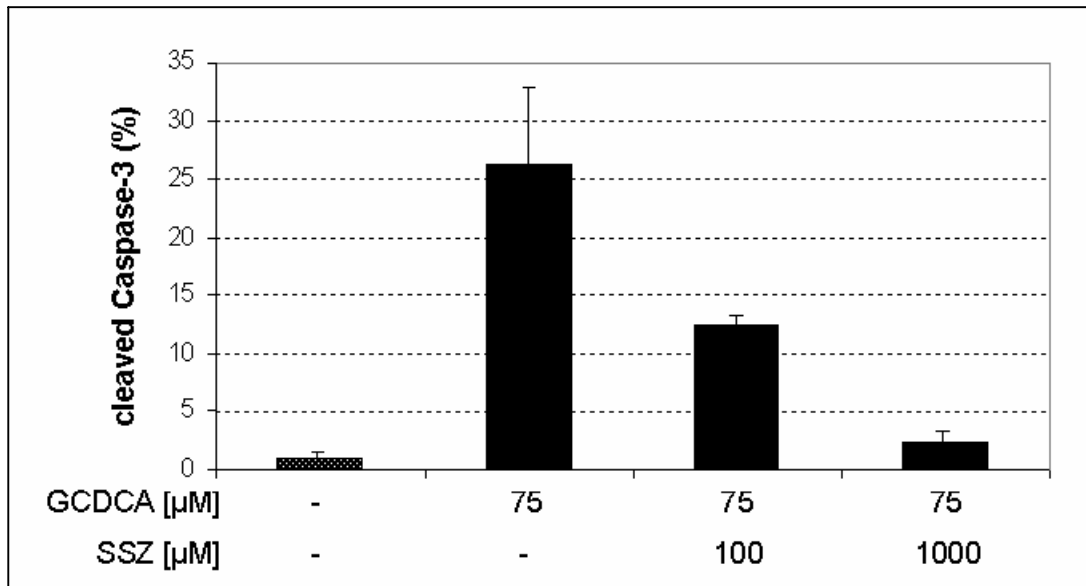


Abbildung 32: Auszählung der Immunocytochemie gegen cleaved Caspase-3. Ungefähr 800 Zellen wurden geblendet pro Stimulation von drei unabhängigen Untersuchenden ausgezählt. Der Anteil cleaved Caspase-3 positiver Zellen bei nicht stimulierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. 100 μM und 1000 μM SSZ reduzieren die GCDCA-vermittelte Aktivierung der Caspase-3 deutlich. (MW \pm SD, n=3)

Da HepG2 Zellen humane Hepatomzelllinien sind, wurde der Einfluss von Sulfasalazin auf die Aktivierung der Caspasen-3 und -7 bei der GCDCA-induzierten Apoptose zusätzlich bei primären Maushepatozyten untersucht. Hier zeigte die Zugabe von 100 μM SSZ und 1000 μM SSZ eine starke Reduktion der Caspase-3/7 Aktivität um 66 % bzw. 88 %. Geringere Konzentrationen von 10 μM und 1 μM Sulfasalazin verringerte die Apoptoserate nicht (siehe Abbildung 33).

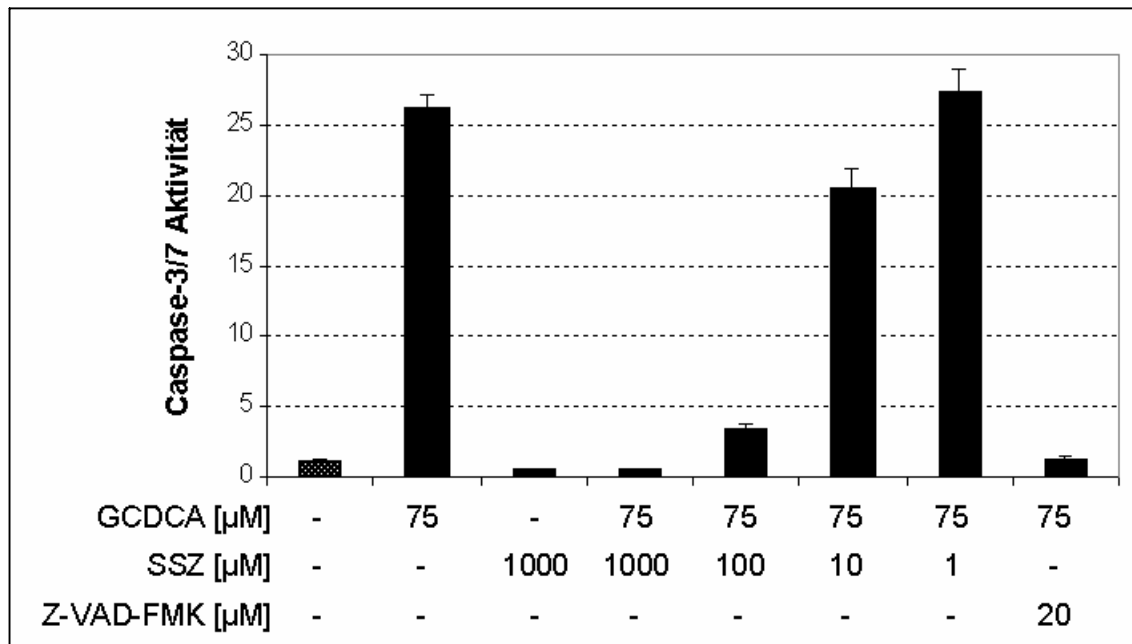


Abbildung 33: Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-vermittelte Apoptose in primären Maushepatozyten dosisabhängig. Primäre Maushepatozyten wurden 16h nach der Isolation für 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μ M GCDCA allein bzw. zusammen mit der angegebenen Konzentration Sulfasalazin (SSZ) inkubiert. Die Apoptoserate wurde durch Messung der Caspase-3/7 Aktivität quantifiziert. Die Spezifität des Assays wird durch den Pancaspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 μ M) gezeigt. Die Caspase-3/7 Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert. Primäre Maushepatozyten wurden durch AG Eichhorst, Med. II, Klinikum Großhadern, isoliert und zur Verfügung gestellt. (MW \pm SD, n=3)

Die Apoptoseinduktion von Hepatozyten nach Inkubation mit Gallensäuren aktiviert beide Initiatorcaspasen-8 und -9. Deshalb wurde der Effekt von SSZ auf die Aktivierung der Caspasen-8 und -9 untersucht. 100 μ M Sulfasalazin reduzierten die Caspase-8 Aktivierung bei gleichzeitiger Stimulation mit 75 μ M GCDCA tendenziell. 1000 μ M SSZ reduzierten sie sogar signifikant. 10 μ M und 1 μ M SSZ veränderten die Caspase-8 Aktivierung nicht (siehe Abbildung 34).

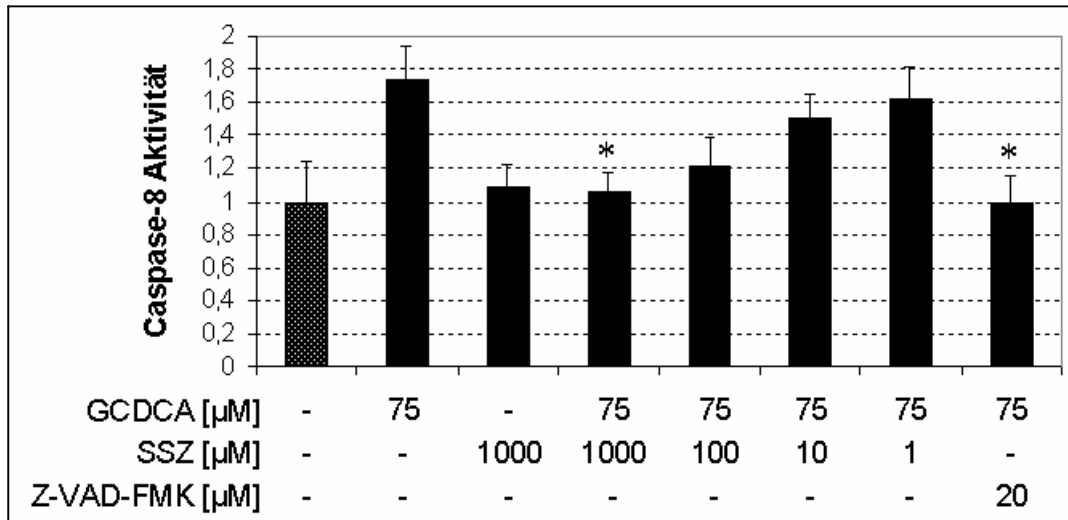


Abbildung 34: Sulfasalazin reduziert die Caspase-8 Aktivität. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 µM GCDCA in Ab- und Anwesenheit der angegebenen Konzentration Sulfasalazin (SSZ) inkubiert. Die Quantifizierung der Caspase-8 Aktivität erfolgte durch Caspase-8-Glo Assay. Der Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 µM) zeigt die Spezifität des Apoptoseassays. Aktivität der nicht stimulierten Zellen auf 1 normiert. (MW ± SD, n=4, * p< 0,05 vgl. 75 µM GCDCA).

Die Aktivität der Caspase-9 wurde von 1000 µM und 100 µM SSZ signifikant reduziert, wohingegen 10 µM und 1 µM SSZ kaum Einfluss hatten. SSZ allein aktivierte die Caspase-9 nicht (siehe Abbildung 35).

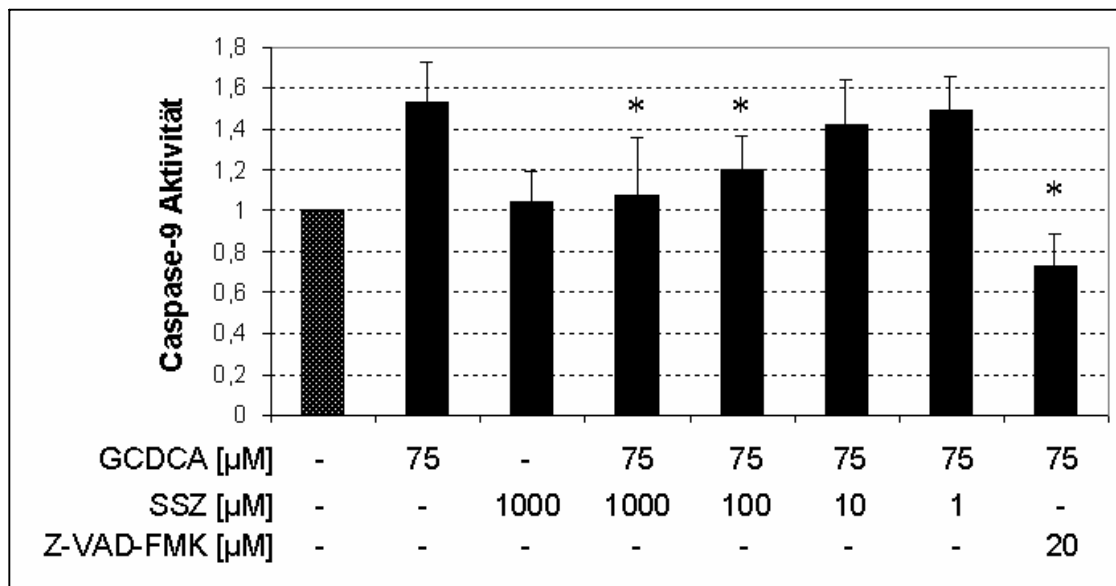


Abbildung 35: Sulfasalazin inhibiert die Caspase-9 Aktivierung. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 µM GCDCA bzw. 75 µM GCDCA mit den angegebenen Konzentrationen Sulfasalazin (SSZ) inkubiert. Die Quantifizierung der Caspase-9 Aktivität erfolgte durch Caspase-9-Glo Assay. Der Pancaspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 µM) zeigt die Spezifität des Apoptoseassays. Aktivität der nicht stimulierten Zellen auf 1 normiert. (MW ± SD, n=4, * p< 0,05 vgl. 75 µM GCDCA)

Die Generierung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROS, *reactive oxygen species*) spielt bei der Gallensäuren-vermittelten Apoptose eine essentielle Rolle, wobei noch nicht geklärt ist, ob die ROS Ursache oder Folge der mitochondrialen Schädigung sind [164, 193]. Inkubation von HepG2-Ntcp Zellen mit 75 μM GCDCA bzw. 20 μM TLCA für 2h erhöhte die Generierung von ROS um 35% bzw. 25% gegenüber nicht stimulierten Zellen. Simultane Stimulation der GCDCA mit 1000 μM und 100 μM SSZ reduzierte die Produktion der reaktiven Sauerstoffintermediate signifikant gegenüber 75 μM GCDCA stimulierten Zellen. 100 μM SSZ erniedrigten die TLCA-induzierte ROS-Bildung ebenfalls; 1000 μM SSZ sogar signifikant gegenüber 20 μM TLCA Stimulation. 10 μM und 1 μM SSZ zeigten keine Effekte auf die ROS-Generierung nach Gallensäuren-Stimulation (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7).

Stimulation	ROS-Bildung
Kontrolle	1,00 \pm 0,12 *
75 μM GCDCA	1,35 \pm 0,17
SSZ 1000 μM	0,97 \pm 0,09 *
75 μM GCDCA + 1000 μM SSZ	1,02 \pm 0,09 *
75 μM GCDCA + 100 μM SSZ	1,14 \pm 0,11 *
75 μM GCDCA + 10 μM SSZ	1,27 \pm 0,09
75 μM GCDCA + 1 μM SSZ	1,30 \pm 0,12

Tabelle 6: Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-vermittelte Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROS). HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Carboxy-H₂DCFDA (4 μM) vorinkubiert und dann 2h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μM GCDCA in An- und Abwesenheit von Sulfasalazin (SSZ) in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Generierung von ROS wurde durch den Anstieg der Fluoreszenz von Carboxy-H₂DCFDA gemessen. ROS-Bildung von nicht stimulierten Zellen auf 1 normiert. (MW \pm SD, n=6, * p<0,05 vgl. 75 μM GCDCA)

Stimulation	ROS-Bildung
Kontrolle	1,00 ± 0,12 *
20 µM TLCA	1,25 ± 0,11
SSZ 1000 µM	1,02 ± 0,08 *
20 µM TLCA + 1000 µM SSZ	1,00 ± 0,04 *
20 µM TLCA + 100 µM SSZ	1,10 ± 0,07 *
20 µM TLCA + 10 µM SSZ	1,21 ± 0,07
20 µM TLCA + 1 µM SSZ	1,25 ± 0,12

Tabelle 7: Sulfasalazin verhindert die TLCA-induzierte Generierung von ROS (*reactive oxygen species*). HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Carboxy-H₂DCFDA (4 µM) vorinkubiert und 2h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 µM GCDCA in An- und Abwesenheit von Sulfasalazin (SSZ) in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Generierung von ROS wurde durch den Anstieg der Fluoreszenz von Carboxy-H₂DCFDA gemessen. ROS-Bildung von nicht stimulierten Zellen auf 1 normiert. (MW ± SD, n=6, * p<0,05 vgl. 75 µM GCDCA)

3.2.1.2. Sulfapyridin und 5-Aminosalicylsäure zeigen keinen Effekt auf die GCDCA-vermittelte Apoptose

Sulfasalazin wird durch Verknüpfung zweier unterschiedlich wirkender Moleküle, Sulfapyridin (SPD) und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA), synthetisiert. Da Bakterien der Darmflora diese Azobindung spalten, wurde die Wirkung der Einzelkomponenten SPD und 5-ASA untersucht. Die Zugabe von 1 µM, 10 µM, 100 µM und 1000 µM Sulfapyridin verringerte die Apoptoserate nicht. SPD allein induzierte keine Apoptose (siehe Abbildung 36).

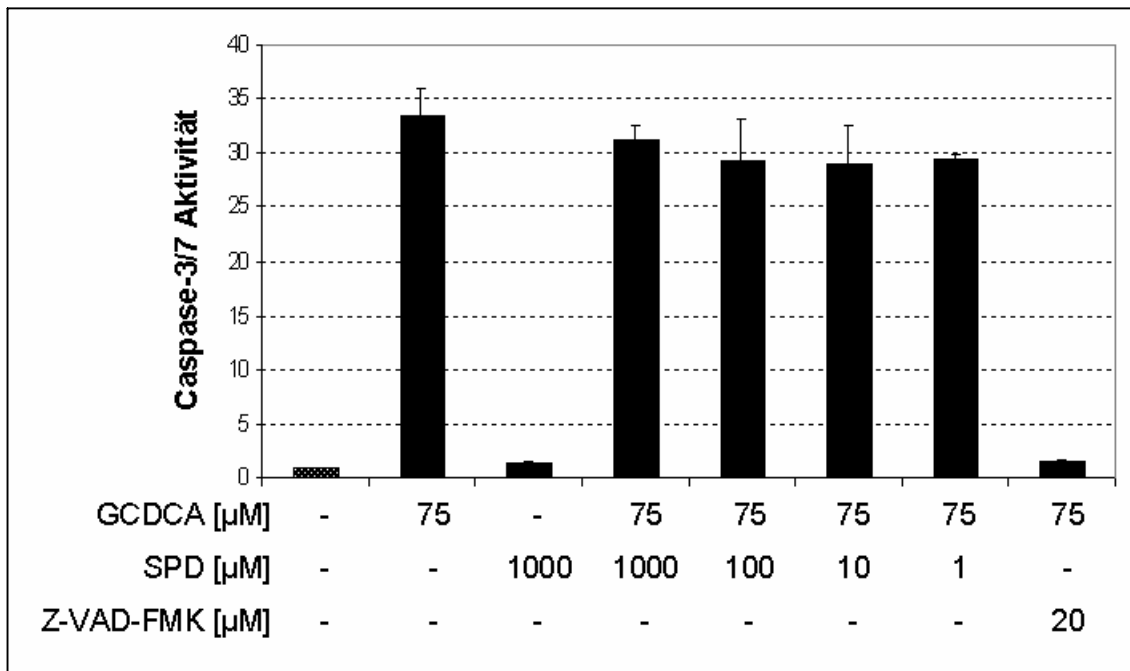


Abbildung 36: Sulfapyridin hat keinen Einfluss auf die GCDCA-induzierte Apoptose. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μM GCDCA allein bzw. zusammen mit der angegebenen Konzentration Sulfapyridin (SPD) inkubiert. Die Apoptoserate wurde durch Messung der Caspase-3/7 Aktivität bestimmt. Der Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 μM) zeigt die Spezifität des Apoptoseassays. Die Caspase-3/7 Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert. (MW \pm SD, n=3) (aus Dissertation Kris Bauchmüller, Med.II, Klinikum Großhadern, LMU München)

Die simultane Inkubation mit Konzentrationen von 1 μM bis 1000 μM 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die GCDCA-induzierte Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen (siehe Abbildung 37).

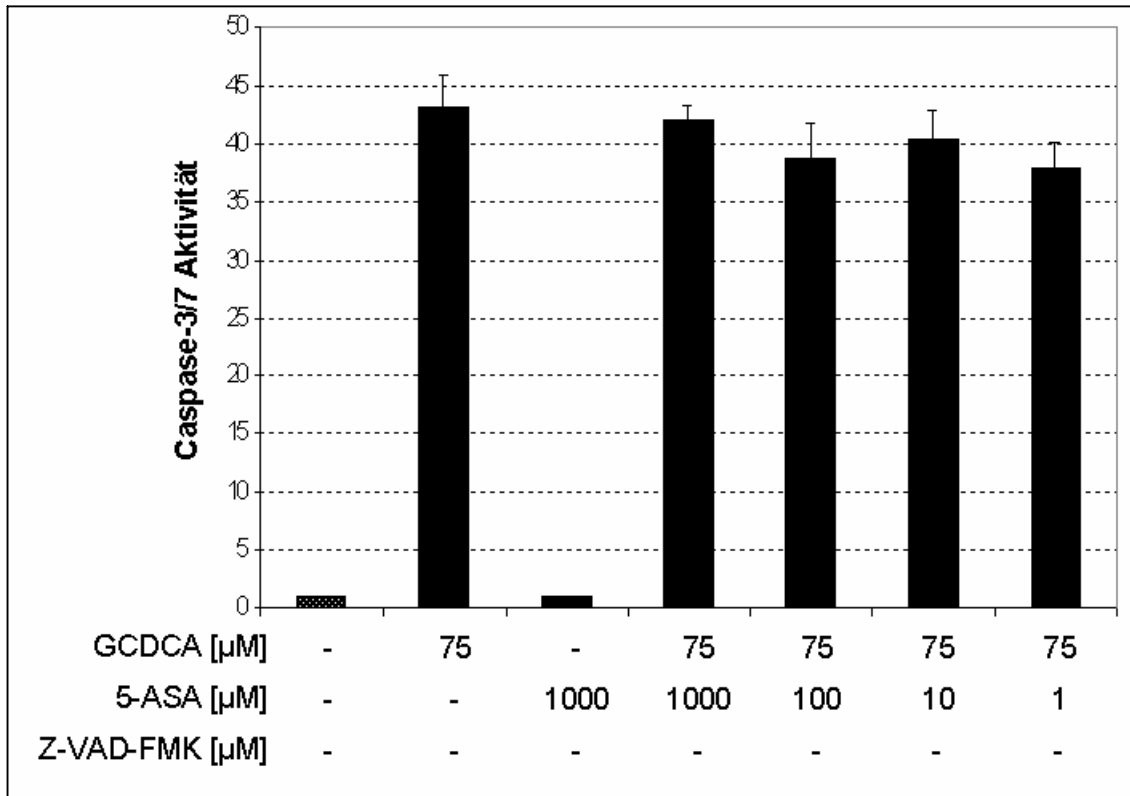


Abbildung 37: 5-Aminosalicylsäure zeigt keine Reduktion der GCDCA-vermittelten Apoptose. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μM GCDCA allein bzw. zusammen mit den angegebenen Konzentrationen 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) inkubiert. Die Apoptoserate wurde durch Messung der Caspase-3/7 Aktivität quantifiziert. Die Caspase-3/7 Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert. (MW ± SD, n=3) (aus Dissertation Kris Bauchmüller, Med.II, Klinikum Großhadern, LMU München)

Sulfasalazin scheint molekulare Mechanismen von Überlebenswegen zu aktivieren, auf die die Einzelkomponenten SPD und 5-ASA keine Wirkung haben.

3.2.1.3. Sulfasalazin inhibiert Gallensäuren-unabhängige Apoptose

SSZ inhibiert die Gallensäuren-induzierte Apoptose auf allen bisher untersuchten Ebenen. Kann SSZ auch Gallensäuren-unabhängige Apoptose verhindern? Staurosporin, ein starker Inhibitor von Serin- und Threoninproteasen, induziert in Hepatozyten Apoptose. Der genaue Mechanismus der Apoptoseinduktion ist noch nicht bekannt, scheint aber Mitochondrien- und Caspasen-abhängig zu sein [53, 64]. Inkubation von HepG2-Ntcp Zellen mit 5 μM Staurosporin (STSP) für 4h induzierte Apoptose und aktivierte Caspase-9 und -3. Simultane Stimulation mit 1000 μM und

100 μM SSZ inhibierte die Staurosporin-vermittelte Apoptose sehr stark. 10 μM und 1 μM SSZ hatten keinen Effekt auf die Apoptoseinduktion durch Staurosporin (siehe Abbildung 38).

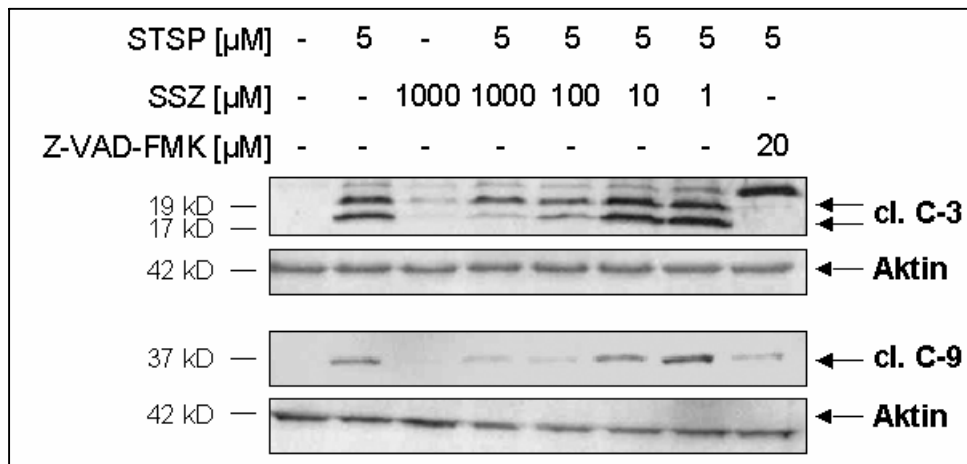


Abbildung 38: SSZ inhibiert Gallensäuren-unabhängige Apoptose. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 5 μM Staurosporin (STSP) in Ab- und Anwesenheit von Sulfasalazin (SSZ) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Western-Blots aus Gesamtzelllysaten mit primären Antikörpern gegen aktivierte (cleaved) Caspase-3 (cl. C-3) und -9 (cl. C-9) zeigen Reduktion der Staurosporin-vermittelten Caspasenaktivierung durch SSZ. Der Inhibitor Z-VAD-FMK (20 μM) hemmt alle Caspasen. Aktin dient als Ladungskontrolle.

3.2.1.4. Sulfasalazin aktiviert NF- κB

Der Effekt von Sulfasalazin auf die Aktivierung von NF- κB wurde mittels Reporterassay und EMSA (*electromobility shift assay*) bestimmt. In der Dissertation von K. Bauchmüller (LMU München) wurde im Reporterassay gezeigt, dass SSZ NF- κB dosisabhängig aktiviert. 1000 μM , 100 μM und 10 μM SSZ steigerte die Aktivität des Transkriptionsfaktors auf das 4,3-, 2- und 1,6-fache verglichen mit nicht stimulierten Zellen. 1 μM SSZ bewirkte eine schwache, aber nicht signifikante Erhöhung auf das 1,2-fache. Die Gallensäure GCDCA allein aktivierte NF- κB ebenfalls leicht um 20% der nicht stimulierten Zellen. Die gleichzeitige Stimulation mit 75 μM GCDCA hatte keinen Einfluss auf die SSZ-vermittelte Aktivierung von NF- κB (siehe Abbildung 39).

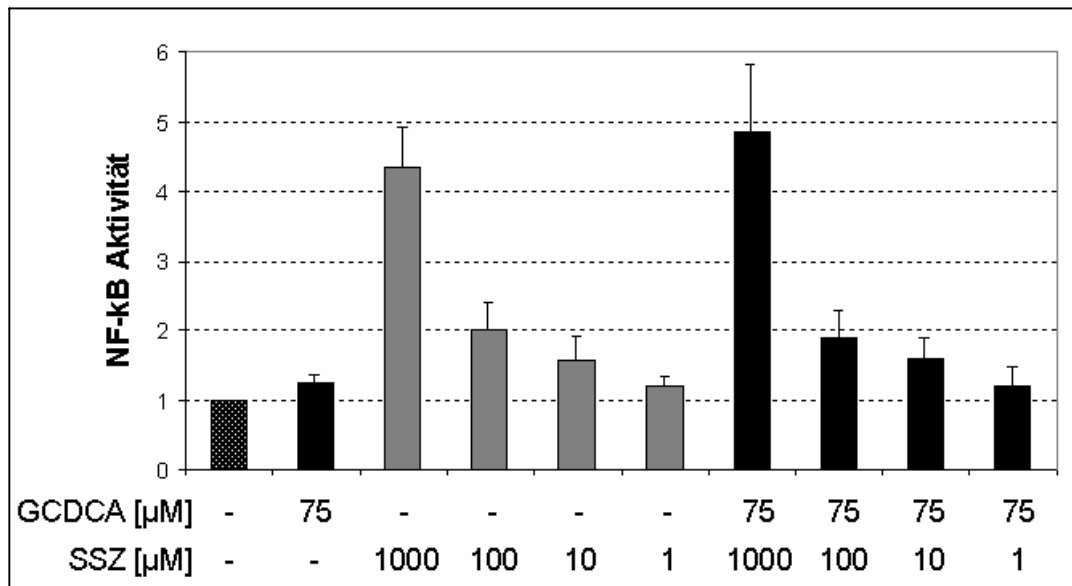


Abbildung 39: Sulfasalazin aktiviert NF- κ B dosisabhängig im Reporterassay. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit den NF- κ B-*Firefly*-Luciferase- und TK-*Renilla*-Luciferase-Plasmiden transfiziert und mit 75 μ M GCDCA allein und den angegebenen Konzentrationen SSZ in Abwesenheit (grau) oder in Anwesenheit (schwarz) von 75 μ M GCDCA stimuliert. Um Unterschiede in den Transfektionseffizienzen auszugleichen, wird die Ratio aus *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase ermittelt. NF- κ B Aktivität der unstimulierten Probe auf 1 normiert. (MW \pm SD, n=3) (aus Dissertation Kris Bauchmüller, Med.II, Klinikum Großhadern, LMU München)

Der *electromobility shift assay* (EMSA) zeigt ebenfalls eine Aktivierung von NF- κ B durch Sulfasalazin. Nach 1h Inkubation mit 100 μ M oder 1000 μ M Sulfasalazin wurde die Bindung an die NF- κ B Bindestelle deutlich erhöht, so dass im EMSA eine Steigerung des Signals zu erkennen ist (siehe Abbildung 40).



Abbildung 40: Sulfasalazin aktiviert NF- κ B im EMSA. HepG2-Ntcp Zellen wurden 1h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 100 μ M bzw. 1000 μ M Sulfasalazin (SSZ) inkubiert. Die Kernextrakte wurden mit radioaktiv markiertem NF- κ B-Oligonukleotid inkubiert. Nach der Bindung an das radioaktive Oligonukleotid wurden die Kernextrakte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Schwärzen des Films detektiert.

3.2.1.5. Sulfasalazin moduliert die Aktivierung der MAPK **(mitogen activated protein kinase)**

Sulfasalazin inhibiert Apoptose in HepG2 Zellen unabhängig vom Stimulus und aktiviert NF- κ B. Moduliert es dabei Signaltransduktionswege und aktiviert weitere Überlebenswege in der Zelle? Eine wichtige Proteingruppe bei hepatozellulären Überlebenswegen ist die Familie der MAPK, die aus drei Subfamilien besteht: ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*cJun N-terminal kinase*) und p38-MAPK. Die Regulation von Apoptose- und Überlebenswegen durch die MAP Kinasen ist noch nicht aufgeklärt. Erk 1/2 wirkt vor allem anti-apoptotisch; JNK und p38 hauptsächlich proapoptotisch [221]. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 75 μ M GCDCA in der Ab- und Anwesenheit von 100 μ M SSZ stimuliert, um die Aktivierung der MAPK-Subfamilien im Western-Blot mit Phospho-spezifischen Antikörpern zu überprüfen. 75 μ M GCDCA zeigten eine starke Aktivierung der JNK, die durch die simultane Inkubation mit 100 μ M SSZ vermindert wurde. In nicht stimulierten und mit 100 μ M SSZ stimulierten Zelllysaten ist die c-Jun N-terminale Kinase nicht phosphoryliert (siehe Abbildung 41).

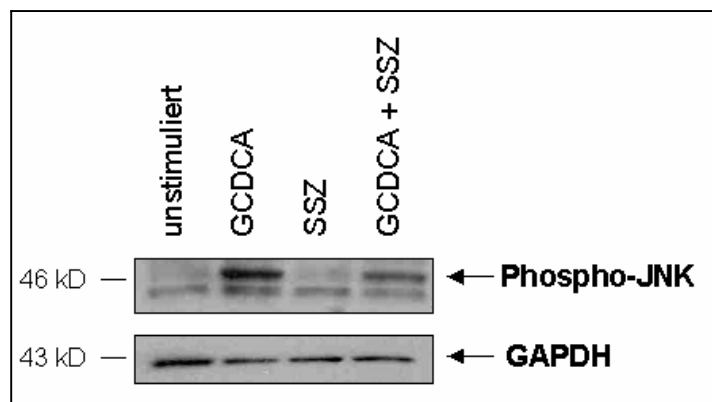


Abbildung 41: Sulfasalazin reduziert die GCDCA-induzierte Aktivierung von JNK. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μ M GCDCA in Ab- und Anwesenheit von 100 μ M SSZ inkubiert. Western-Blot aus Gesamtzelllysaten mit primärem Antikörper gegen Phospho-JNK zeigt aktivierte c-Jun N-terminale Kinase (JNK). GAPDH dient als Ladungskontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot.

Mit Trägermedium inkubierte und mit 100 μ M SSZ stimulierte HepG2-Ntcp Zelllysate zeigten eine schwache Phosphorylierung der p38-MAPK (*p38 mitogen-activated kinase*), die durch Stimulation mit 75 μ M GCDCA für 4h verstärkt wurde. Zugabe von 100 μ M SSZ zur Gallensäure verhinderte die verstärkte Aktivierung durch GCDCA (siehe Abbildung 42).

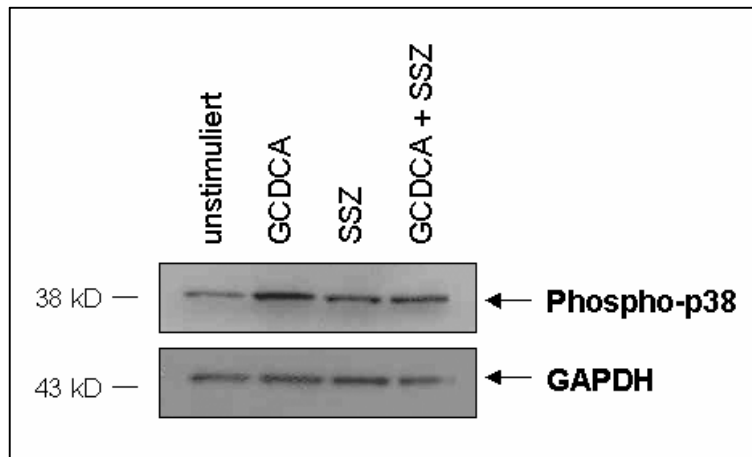


Abbildung 42: Sulfasalazin reduziert die GCDCA-vermittelte Aktivierung der p38-MAPK. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μ M GCDCA in Ab- und Anwesenheit von 100 μ M SSZ inkubiert. Western-Blot aus Gesamtzelllysaten mit primärem Antikörper gegen Phospho-p38 zeigt aktivierte p38-MAPK (*p38 mitogen-activated kinase*). GAPDH dient als Ladungskontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot.

Erk 1/2 sind in nicht stimulierten HepG2-Ntcp Zellen bereits aktiv. Die Phosphorylierung dieser Kinasen bleibt bei allen experimentellen Bedingungen unverändert (siehe Abbildung 43).

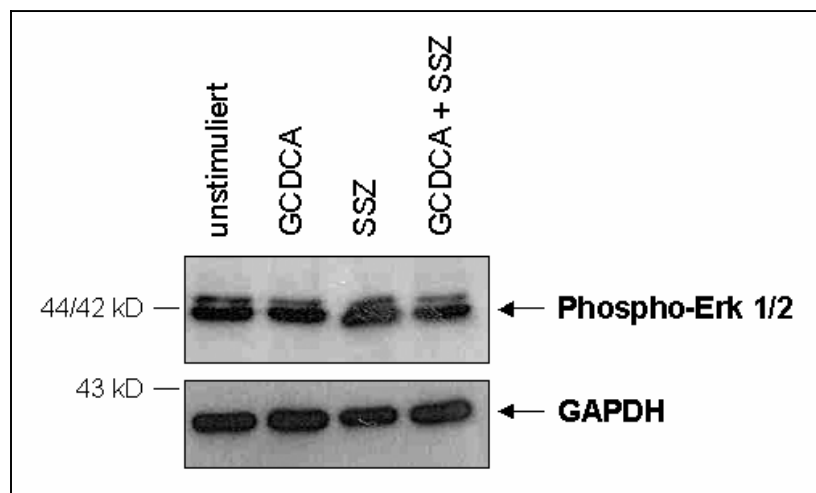


Abbildung 43: Sulfasalazin hat keinen Effekt auf die Aktivierung von Erk 1/2. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μ M GCDCA in An- und Abwesenheit von 100 μ M SSZ inkubiert. Western-Blot aus Gesamtzelllysaten mit primärem Antikörper gegen Phospho-Erk 1/2 zeigt aktivierte Erk 1/2 (*extrazellulär signal-regulated kinases*). GAPDH dient als Ladungskontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot.

3.2.2. Transkriptionsanalyse

Gallensäuren, wie GCDCA, und Sulfasalazin verändern die Aktivität der MAP Kinasen und von NF-κB (siehe 3.2.1. Einfluss von Sulfasalazin auf die GCDCA-vermittelte Apoptose). Da sowohl die MAPK als auch der Transkriptionsfaktor NF-κB die Transkription von vielen Genen beeinflussen, wurde die transkriptionelle Veränderung nach Stimulation mit Gallensäuren in An- und Abwesenheit von Sulfasalazin untersucht.

3.2.2.1. Transkriptionsscreen: cDNA-Microarray

Für eine umfassende Expressionsanalyse wurden HepG2-Ntcp Zellen 4h mit 75 µM GCDCA mit und ohne Sulfasalazin (100 µM) inkubiert oder nicht stimuliert. Die Ergebnisse des Arrays geben einen Überblick über das veränderte Gentranskriptionsmuster, das durch Gallensäurenstimulation in An- und Abwesenheit von Sulfasalazin ausgelöst wird.

Da vor allem die Gallensäuren-induzierte Apoptose und ihre Inhibition durch Sulfasalazin von Interesse waren, wurde der humane PIQOR (*Parallel Identification and Quantification of RNAs*) *Cell Death* Microarray (Memorec, Köln) verwendet. Dieser Microarray besteht aus einem Glasobjektträger, auf dem 500 apoptosespezifische, doppelsträngige cDNA-Sequenzen mit 200 - 400 Basenpaaren in bestimmter Anordnung 4-fach gespottet wurden. Das Prinzip und Arbeitsschema der Microarraytechnologie ist aus Abbildung 44 zu entnehmen.

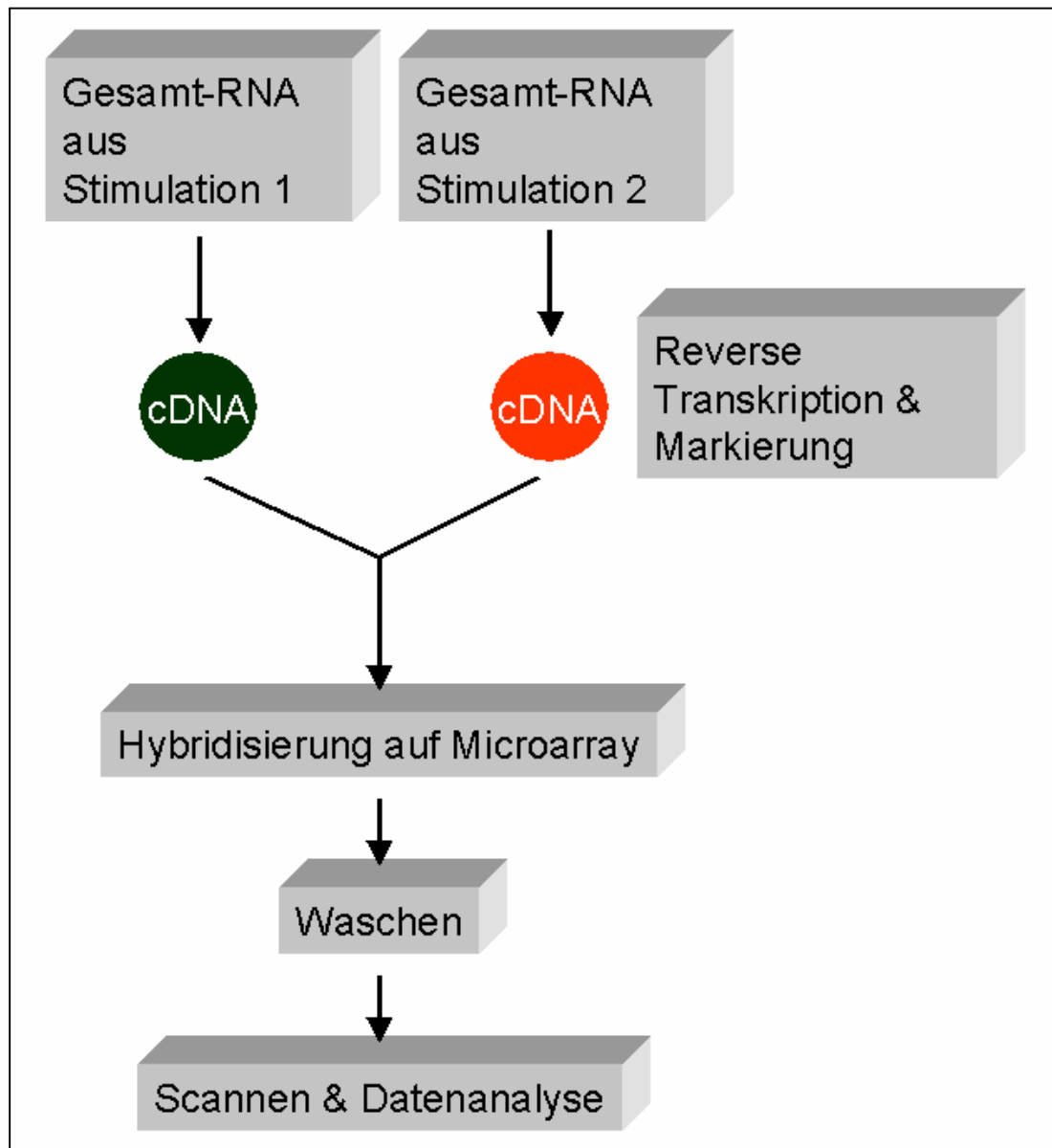


Abbildung 44: Arbeitsschema zur Durchführung eines Microarrays. Nach Stimulation wird die mRNA der Zellen in cDNA umgeschrieben und dabei mit Cy3 (grün) bzw. Cy5 (rot) markiert. Die unterschiedlich markierten cDNAs zweier Stimulationen werden vereinigt und auf einem Microarray hybridisiert. Nach mehreren Waschvorgängen wird der Array nach Cy3 und Cy5-Fluoreszenzsignalen gescannt. Die Datenanalyse erfolgt durch Übereinanderlegen der Signalintensitäten von Cy3 und Cy5.

Da nur zwei unterschiedliche Proben auf einem Array analysiert werden können und nur ein Vergleich der Signale auf einem Array zulässig ist, wurden zwei Microarrays durchgeführt. Der erste verglich 4h mit 75 μ M GCDCA stimulierte HepG2-Ntcp Zellen mit unstimulierten. Der zweite Array zeigte die Unterschiede zwischen HepG2-Ntcp Zellen, die 4h mit 75 μ M GCDCA inkubiert wurden, in An- und Abwesenheit von 100 μ M Sulfasalazin. Die Gesamt-RNA der unstimulierten, 4h mit 75 μ M GCDCA stimulierten und 4h mit 75 μ M GCDCA und 100 μ M Sulfasalazin stimulierten HepG2-

Ntcp Zellen wurde isoliert und deren Qualität und Quantität mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) analysiert. Abbildung 45 zeigt das Elektropherogramm (A) sowie die Elutionsdiagramme (B) der RNAs.

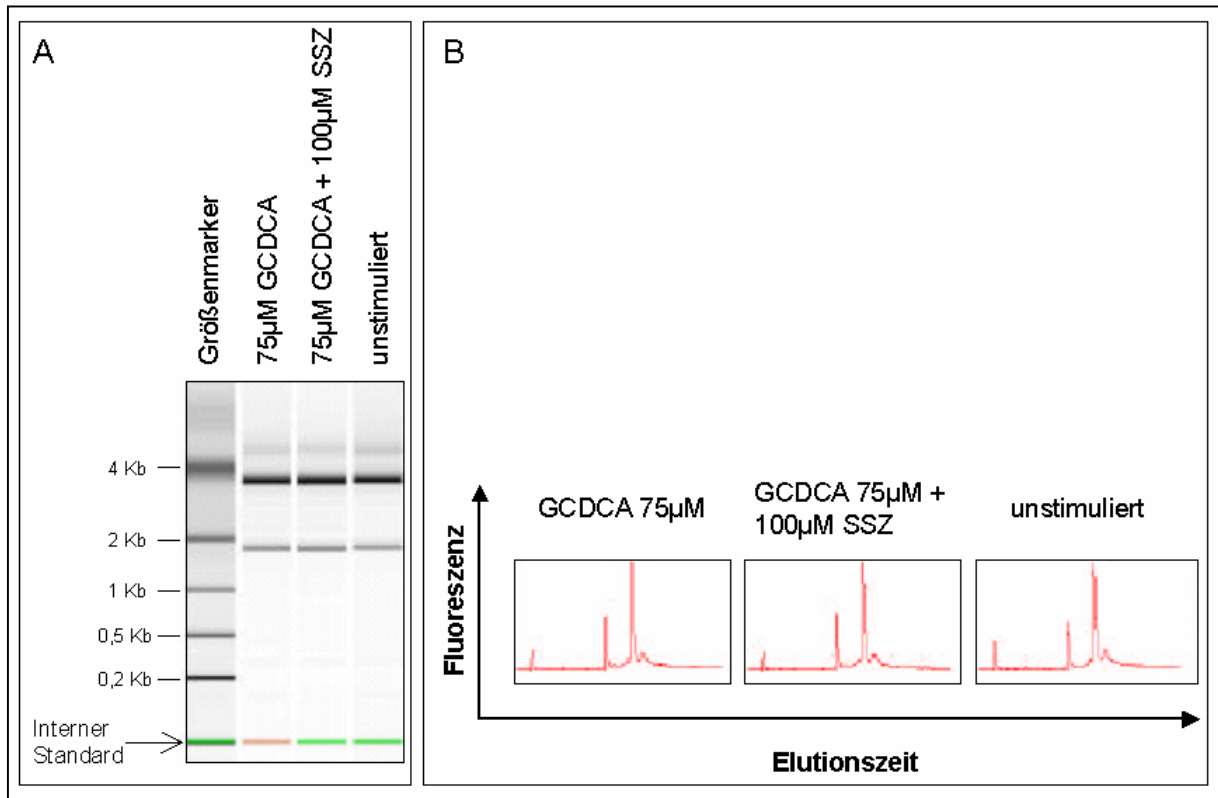


Abbildung 45: Qualität und Quantität der Gesamt-RNA. (A) Elektropherogramm sowie (B) Elutionsdiagramme der Gesamt-RNA der stimulierten HepG2-Ntcp Zellen. 1µl der Gesamt-RNA wurde mittels Bioanalyzer 2100 untersucht. Es wurde interner Standard zugegeben, der zur Quantifizierung der RNA herangezogen wird. (A) Elektropherogramm: Die dominante obere Bande repräsentiert die 28S-ribosomale RNA (rRNA), die mittlere die 18S rRNA und die untere Bande den internen Standard. (B) Elutionsdiagramme: Der jeweils erste Peak repräsentiert den internen Standard. Die beiden herausragenden Peaks zeigen die 18S (links) und 28S (rechts) rRNA.

Da die Gesamt-RNA von guter Qualität war und keine Degradierungen aufwies, wurde die mRNA angereichert, in cDNA transkribiert und markiert. Die cDNA der 4h mit 75 µM GCDCA stimulierten Zellen wurde mit Cy5 (rot) gekennzeichnet. Die cDNA der unstimulierten und 4h mit 75 µM GCDCA in Anwesenheit von 100 µM Sulfasalazin stimulierten Zellen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (grün) markiert. Nach Hybridisierung, Waschen und Scannen lieferte das Übereinanderlegen der aufgenommenen Bilder das in Abbildung 46 zu sehende Ergebnis. In den Overlays erscheinen Signale mit stärkerer Cy5-Fluoreszenz rot, mit stärkerer Cy3-Fluoreszenz grün. Sie zeigen, dass das entsprechende Gen in der Cy5

bzw. Cy3-markierten Probe stärker exprimiert wurde. Gelbe Signale traten auf, wenn beide Fluoreszenzen die gleiche Intensität aufwiesen und das entsprechende Gen in beiden Proben gleich stark exprimiert wurde.

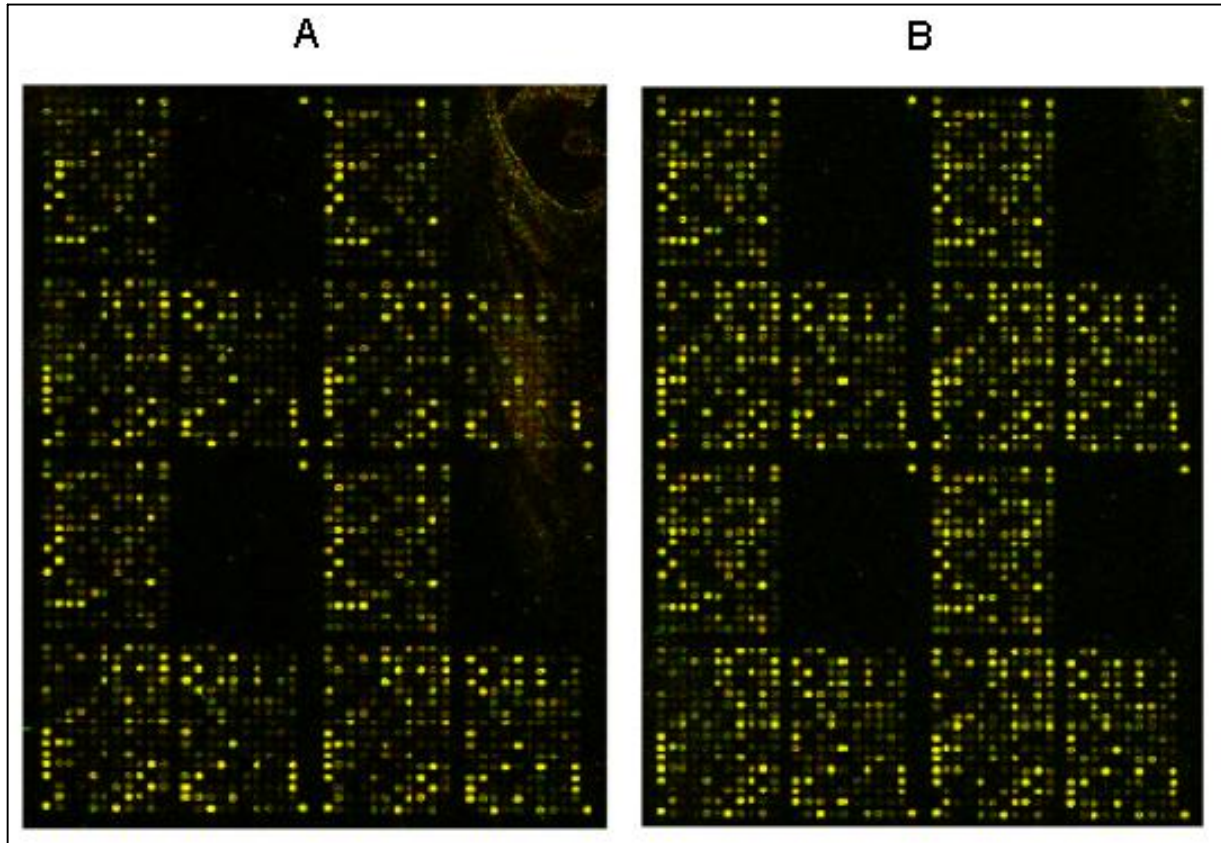


Abbildung 46: Übereinandergelegte Scans der Microarrays nach Cy3 und Cy5 Fluoreszenzsignalen. (A) Microarray mit 4h 75 μ M GCDCA stimulierten (Cy3-markiert, grün) und unstimulierten Proben (Cy5-markiert, rot). **(B)** Microarray mit 4h 75 μ M GCDCA stimulierten (Cy3-markiert, grün) und 4h 75 μ M GCDCA und 100 μ M SSZ stimulierten Proben (Cy5-markiert, rot).

Die Signalintensitäten wurden mittels Scanner der Firma Memorec gemessen und quantifiziert. In der Darstellung der Cy5- und Cy3-Signalintensitäten im doppellogarithmischen Scatterplot (siehe Abbildung 47) liegen alle Gene, deren Expression nicht modifiziert wurde, auf der Diagonalen des Diagramms. Gene, die aufgrund der Stimulation mit der Gallensäure bzw. der Gallensäure und Sulfasalazin unterschiedlich exprimiert wurden, liegen außerhalb dieser Diagonalen.

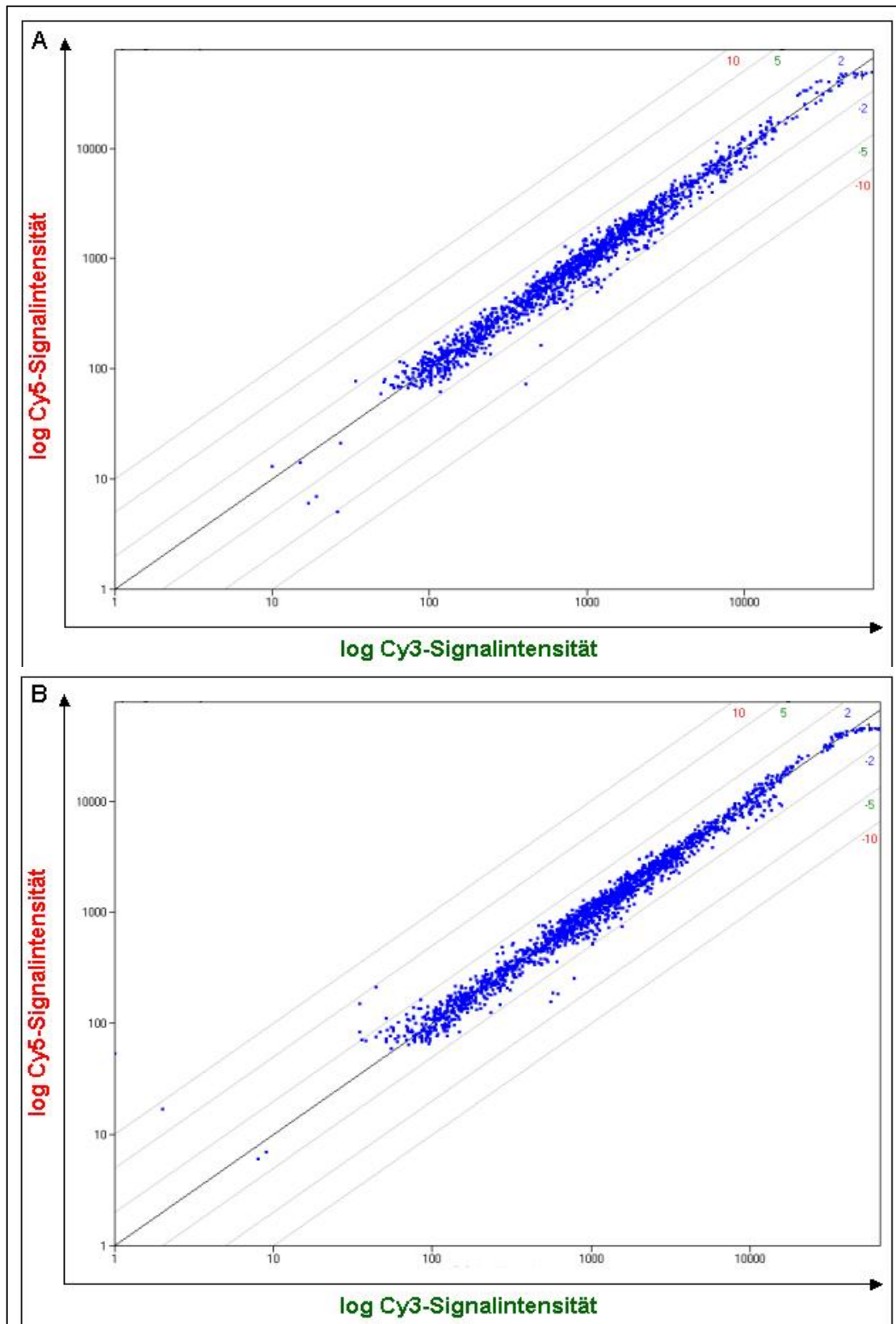


Abbildung 47: Scatterplot der Signalintensitäten. Die Signalintensität jeder cDNA ist als Punkt erkennbar. Doppellogarithmische Darstellung mit Cy3-Intensitäten auf Abszisse und Cy5-Intensitäten auf Ordinate. Schwach gekennzeichnete Diagonalen markieren Bereiche der n-fach differentiellen Signalintensitäten. **(A)** 75 µM GCDCA und nicht stimulierte Zellen. **(B)** 75 µM GCDCA stimulierte Probe, in An- und Abwesenheit von 100 µM SSZ.

In nachfolgender Tabelle 8 sind alle Gene aufgelistet, deren Signalintensitäten mindestens 2-fach über dem Mittelwert der Signalintensitäten des Hintergrunds lagen und durch die Stimuli unterschiedlich reguliert wurden. Eine Ratio der Signalintensitäten von 1 bedeutet keine Modulation in der Transkription. Ein Wert kleiner 1 entspricht einer höheren Cy3-Fluoreszenz, d.h. einer stärkeren Transkription in den 75 µM GCDCA behandelten HepG2-Ntcp Zellen im Vergleich zu unstimulierten oder mit GCDCA und 100 µM Sulfasalazin stimulierten Zellen. Quotienten über 1 zeigen stärkere Cy5-Fluoreszenz an und verstärkte Expression in unstimulierten bzw. mit GCDCA und SSZ inkubierten HepG2-Ntcp Zellen. Die gelb markierten Gene Bcl-X_L, cFos, JunB, RelB und Rox wurden durch quantitative RT-PCR genauer untersucht.

	Gen	Kontrolle/ GCDCA	GCDCA+SSZ/ GCDCA	Beschreibung
#1	BCL2L1/ Bcl-X	0.71 / 6%	0.78 / 7 %	Bcl2 Protein in der äußeren mitochondrialen Membran; 2 Splicevarianten. Längere: Bcl-X _L , apoptotischer Inhibitor; kürzere: Bcl-X _S , apoptotischer Aktivator
#2	EDA	0.69 / 12%	0.88 / 5 %	Ectodysplasin – kollagenartiges, trimeres Typ II Membranprotein mit TNF-like Domäne
#3	MAPK4/ ERK4/ P63-MAPK	0.82 / 15 %	1.97 / 19 %	<i>mitogen-activated protein kinase 4</i> ; Extrazelluläre, Signalregulierte Kinase 4; MAPK Isoform p68; Phosphotransferase; Serin-/Threoninspezifische Proteinkinase
#4	GADD34	0.56 / 4 %	0.66 / 9 %	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein</i> ; Phosphatase-1 Aktivität; SNF5/INI1 Protein fördert Wirkung von GADD34; Bag-1 inhibiert GADD34
#5	Caspase-8	0.97 / 4 %	1.32 / 8 %	Initiatorcaspase im DISC-Komplex
#6	TNFSF5	1.08 / - %	1.52 / 14 %	Glyco- und Transmembranprotein, Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamilie Member 5 (CD40 Ligand); Funktion unbekannt
#7	MCL1	0.69 / 8 %	0.76 / 7 %	antiapoptotisches Bcl-2 Protein; 2 Spliceformen. Längere: Isoform1 MCL1, inhibiert Apoptose und fördert Zellüberleben; kürzere: Isoform 2 induziert Zelltod

	Gen	Kontrolle/ GCDCA	GCDCA+SSZ/ GCDCA	Beschreibung
#8	LIG4	1.16 / 5 %	1.61 / 2 %	ATP-abhängige DNA Ligase IV; DNA Reparatur; DNA Replikation; DNA Rekombination; Zellteilung; nukleäres Protein
#9	Angiogenin	0.84 / 3 %	1.28 / 2 %	tRNA-spezifische Ribonuklease; hydrolysiert tRNAs, hemmt Proteinbiosynthese; induziert Vaskularisierung von normalen und malignen Geweben
#10	HSC73	1.35 / 2 %	1.01 / 4 %	Hitzeschockprotein 71 kD; gehört zur Hitzeschockproteinfamilie Hsp70; Chaperon
#11	HSPA1A	0.75 / 8 %	0.61 / 4 %	Hitzeschockproteinfamilie Hsp70; Chaperon; beteiligt an Ubiquitin-Proteasom-Signalweg durch Interaktion mit RNA-Bindungs-Protein 1
#12	STCH	0.54 / 2 %	0.88 / 2 %	ATPase eines Mikrosom-Stress 70 Proteins
#13	FOS_1 / cFos	0.25 / 40 %	0.31 / 7 %	p55-Proto-Oncogen Protein; nukleäres Phosphoprotein, bildet mit anderen Proteinen den AP-1 Komplex; wichtig für Entwicklung, Signaltransduktion, Zellproliferation und Differenzierung; Heterodimer; Mitglied der bZIP Familie
#14	FOSL1 / FRA1	0.72 / 9 %	0.65 / 1 %	<i>Fos-related antigen-1</i> ; nukleäres Protein; DNA-Bindung
#15	JUNB	0.46 / 7 %	0.50 / 4 %	Komponente des AP-1 Transkriptionsfaktors; nukleäres Protein; Mitglied der bZIP Familie
#16	HSP84_3PR I / HSP90B	0.79 / 13 %	0.68 / 3 %	ATP-bindendes Hitzeschockprotein HSP 90-BETA (HSP 84/HSP 90); Chaperon
#17	ZNF216	0.65 / 4 %	0.82 / 9 %	Zinkfinger-Protein 216
#18	IKBA (I-κ Bα)	0.65 / 1 %	0.79 / 6 %	NFKBIA/ NFKBI/ MAD3; Inhibitor von NF-κB; Serinphosphorylierung und Proteasomdegradierung inhibieren I-κB alpha
#19	NFKB2	0.60 / 6 %	0.69 / 3 %	NF-κB2 p105 Untereinheit
#20	RELB	0.56 / - %	0.73 / 2 %	Transkriptionsfaktor; inhibiert eventuell NF-κB; gehört zu Rel/ Dorsalfamilie
#21	MNT/ ROX	0.50 / 6 %	0.68 / 7 %	nukleäres Protein; Heterodimer mit MAX, bindet DNA und wirkt als Transkriptionsrepressor; bindet an E Box (CACG(T/C)G)

	Gen	Kontrolle/ GCDCA	GCDCA+SSZ/ GCDCA	Beschreibung
#22	IKKGamma/ NEMO/ FIP3	0.57 / 1 %	0.70 / 6 %	I-κB Kinase-assoziiertes Protein, essentieller Modulator von NF-κB (NEMO); Assoziation mit TANK; Komplex mit Hsp70
#23	MYCL1/ MYCL/ LMYC	1.14 / - %	1.67 / - %	L-Myc-1 Proto-Oncogen-Protein; nukleäres Protein; Dimere mit anderen Proteinen (z.B. MAX), dann DNA-Bindung; Funktion bei alternativer mRNA-Prozessierung
#24	TFE3	0.53 / 4 %	0.67 / 8 %	Transkriptionsfaktor 3; <i>helix-loop-helix</i> Protein; bindet an E-Box und Enhancer der Immunglobulin-heavy-chain; wirkt mit E2F2-Transkriptionsfaktor zusammen
#25	TP53BP2/ ASPP2	0.74 / 4 %	0.92 / 5 %	Tumor Protein p53 <i>binding protein 2</i> ; bindet an DNA-spezifische Stelle von p53; cytosolisches Protein
#26	TTRAP	1.42 / 6 %	1.13 / 6 %	<i>TRAF and TNF receptor-associated protein</i> ; Phosphodiesterase; assoziiert mit CD40; TNF-Rezeptor-75 und TRAFs; inhibiert NF-κB Aktivierung
#27	IRAK2	0.64 / 7 %	0.76 / 11 %	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase-2</i> ; NF-κB Aktivierung; interagiert mit TRAF6; assoziiert mit IL-1-Rezeptor; Serin-/Threoninproteinkinase
#28	MADD/ DENN/ IG20	0.77 / 8 %	0.91 / 7 %	<i>MAP-kinase activating death domain protein</i> ; antiapoptotische Zellüberlebensprozesse in Krebszellen; interagiert mit TNF-Rezeptor-Typ I; aktiviert MAPK/ERK/ NF-κB/ Caspase-8/-3
#29	MAP3K5/ MAPKKK5/ MEKK5	0.77 / - %	1.72 / - %	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i> ; phosphoryliert und aktiviert <i>downstream MAPKK4 in vitro</i> und aktiviert SAPK (<i>c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinase</i>)
#30	NOD2/ CARD15/ IBD1	1.41 / - %	1.16 / - %	antibakterieller Faktor bei interstitiellen Epithelzellen; Zusammenhang mit Morbus Crohn
#31	Bcl-XL	0.80 / 3 %	0.81 / 10 %	siehe #1
#32	Bcl-Xs-XI	0.77 / 2 %	0.81 / 3 %	siehe #1
#33	1110065D03	0.78 / 1 %	0.65 / 18 %	<i>Ras-like GTPase</i>
#34	PGRP-L	1.11 / 7 %	1.48 / 5 %	N-Acetyl-Muramoyl-L-Alanin-Amidase

3.2. Transkriptionelle Modulation während der Gallensäuren-induzierten Apoptose

	Gen	Kontrolle/ GCDCA	GCDCA+SSZ/ GCDCA	Beschreibung
#35	RAD	0.62 / 10 %	0.59 / 16 %	<i>Ras-related associated with diabetes</i> ; GTP-Bindungsprotein; Mitglied der Ras-Familie; Überexpression in Muskeln von Typ-II Diabetikern
#36	RAP2B	0.77 / 6 %	0.69 / 4 %	<i>Ras-related protein Rap-2b</i> ; gehört zur <i>small GTPase</i> Superfamilie
#37	RAS-Q9BPW	1.12 / 2 %	1.43 / - %	<i>RAS-like GTPase</i>
#38	VTS58635	0.71 / 7 %	0.66 / 7 %	<i>RAS-like protein</i>
#39	ANK1	1.06 / 24 %	1.50 / 17 %	Ankyrin 1; Bestandteil Plasmamembran v.a. von Erythrozyten; Wechselwirkung mit Anionenkanal
#40	CARD10/ BIMP1	0.75 / 7 %	0.70 / 5 %	<i>caspase recruitment domain protein 10</i> ; Aktivator von NF-κB; Bindeglied zwischen Proteinkinase C-Aktivierung und Bcl10-vermittelter NF-κB Induktion
#41	DEDPRO2	0.66 / 11 %	0.65 / 3 %	<i>death effector domain-containing protein 2</i> ; nukleäres Protein; DNA-Bindung; interagiert mit Caspasen-8/-10; Funktion nicht geklärt
#42	MLT/ MALT1	0.93 / 5 %	0.68 / 6 %	Paracaspase; wird bei Mucosa-assoziierten Lymphomen mit BIRC3 und Immunglobulin-heavy-chain Genloci chromosomal transloziert
#43	PUMA/ BBC3	0.56 / 8 %	0.72 / 8 %	proapoptotisches <i>BH3-only</i> Protein; p53 induziert Transkription von PUMA; vermittelt Apoptose in kolorektalen Krebszellen
#44	RASSF3	0.74 / 11 %	0.69 / 1 %	<i>Ras association domain family 3</i> ; evtl. involviert in Ras-like Signaltransduktion
#45	RIG-I	1.37 / 9 %	1.08 / - %	RNA Helicase
#46	BMF	1.08 / 14 %	1.39 / 23 %	proapoptotisches <i>BH3-only</i> Protein; bindet Bcl-2; Aktivierung durch Anoikis; Interagiert mit Myosin V Motor
#47	TNFRSF19L RELT	0.87 / 11 %	0.75 / 7 %	TNF-Rezeptor Superfamilienmitglied 19L; aktiviert NF-κB; evtl. wichtig bei T-Zell Aktivierung; assoziiert mit TRAF1

	Gen	Kontrolle/ GCDCA	GCDCA+SSZ/ GCDCA	Beschreibung
#48	TWEAKR	0.92 / 9 %	0.62 / 5 %	TNF-Rezeptor Superfamilienmitglied FN14; Typ I Transmembranprotein; beeinflusst Fibroblasten Adhäsion und Migration; stark exprimiert in humanen und murinen hepatozellulären Karzinomen
#49	KIAA0680	1.41 / 3 %	1.20 / 5 %	Chromosome 6 <i>open reading frame</i> 56 T00359
#50	MD1	2.32 / - %	1.99 / - %	Lymphocyten-Antigen 86; vermittelt Immunantwort; extrazelluläres Protein, das auf der Oberfläche an CD180 gebunden ist
#51	AXUD1/ URAX1/ TAIP-3	0.70 / 8 %	0.58 / 4 %	nukleäres Protein; evtl. Tumorsuppressorfunktion; reduzierte Expression in Leber-, Lungen-, Colon-, Nierenkarzinomen
#52	NADE/ NGFRAP1/ BEX3	1.47 / 4 %	1.44 / 3 %	Suppressor des zellulären Wachstums; involviert in Signaltransduktion via Neutrophin-Rezeptor p75NTR
#53	SSECKS/ AKAP12/ AKAP250	1.61 / 7 %	1.20 / 5 %	bindet an regulatorische Untereinheit von PKA und PKC und weist Holoenzym Lokalisation zu; Funktion bei Zellwachstum und Signaltransduktion
#54	TANK/ ITRAF	0.73 / 3 %	0.88 / 3 %	reguliert TRAF-vermittelte Signaltransduktion; Überexpression inhibiert TRAF2-vermittelte NF-κB-Aktivierung durch CD40, TNFR1 oder TNFR2; interagiert mit TRAF-1/-2/-3; cytoplasmatisch
#55	GADD45B/ MYD118	0.72 / 9 %	0.70 / 12 %	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 beta</i> ; negative Wachstumsregulation

Tabelle 8: Auflistung der Gene mit modulierter Transkription. Spalte 2 gibt den Gennamen an, Spalten 3 und 4 den Quotienten der Mittelwerte der Signalintensitäten von den angegebenen Proben ([GCDCA] = 75 µM; [SSZ] = 100 µM). Die Prozentangaben geben die Standardabweichungen der Intensitätsschwankungen der auf dem Chip vierfachgespotteten Gene an. Keine Abweichung ist angegeben, wenn nur einer der vier Spots auswertbar war. Gelb markierte Gene wurden durch quantitative RT-PCR untersucht.

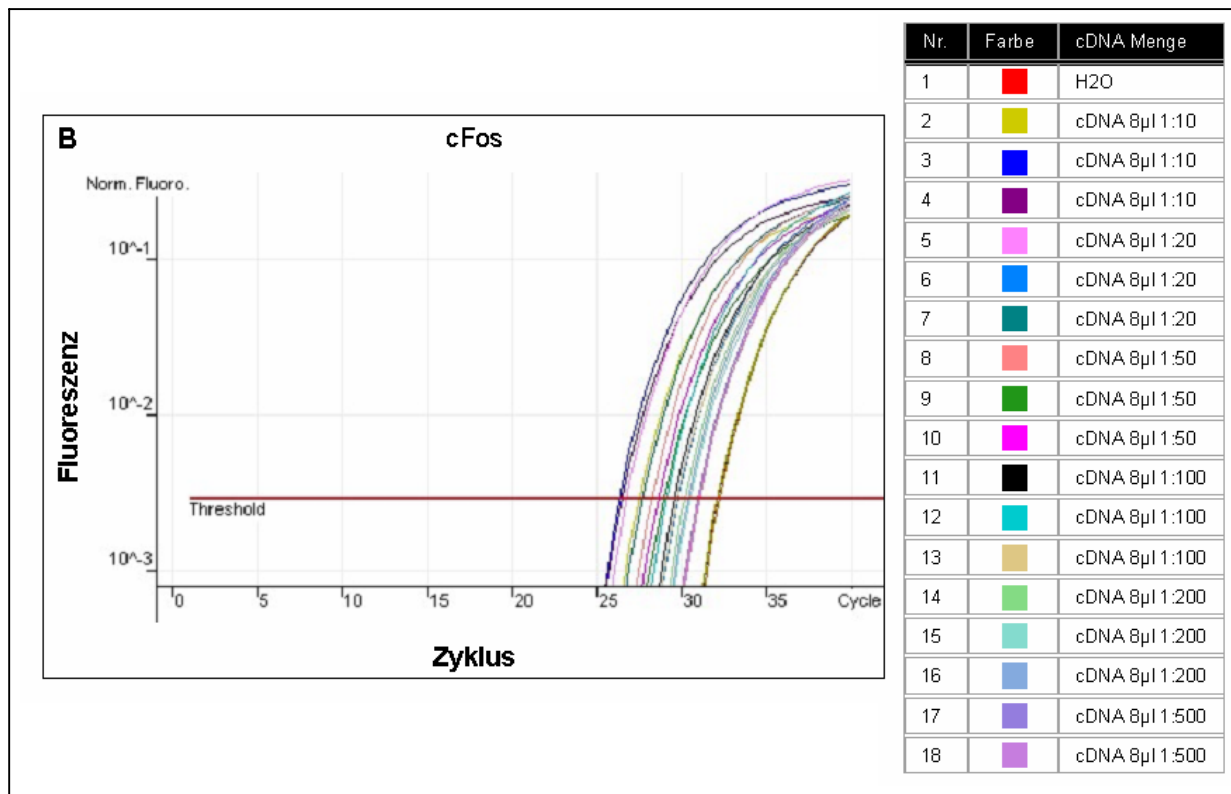
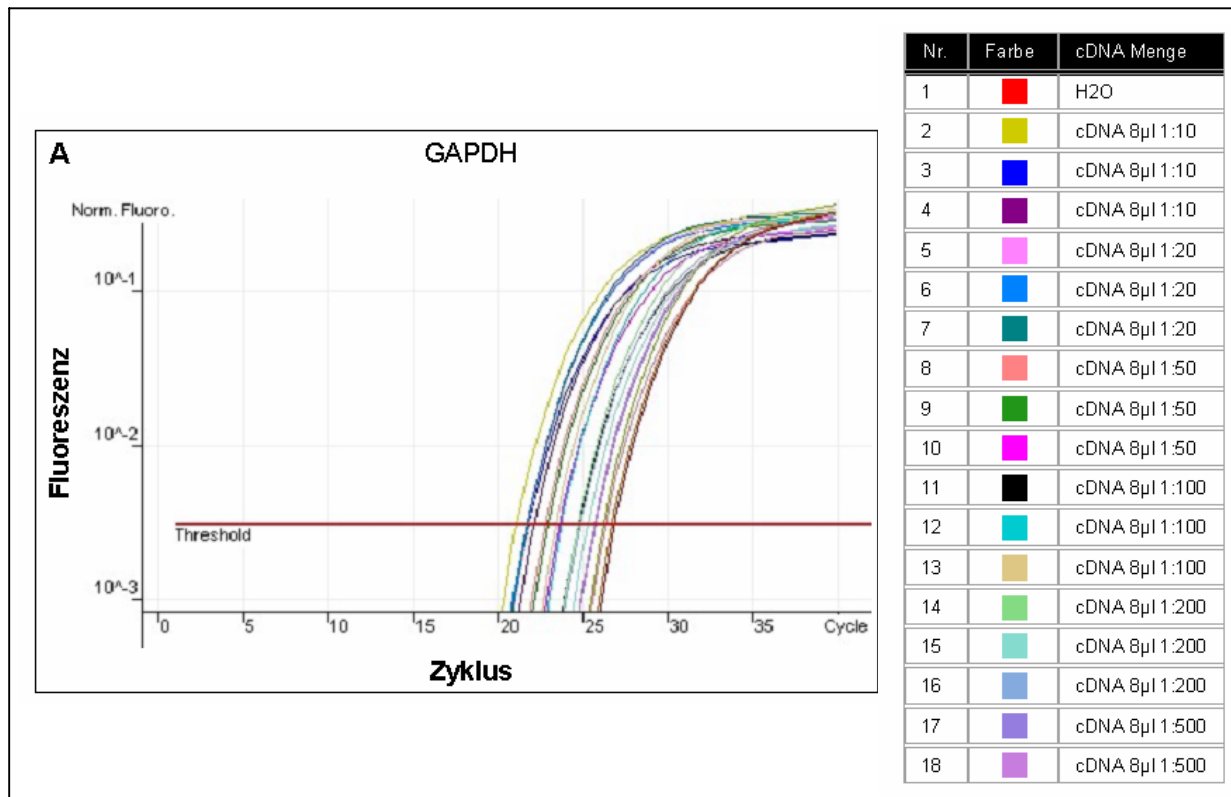
3.2.2.2. Quantitative RT-PCR

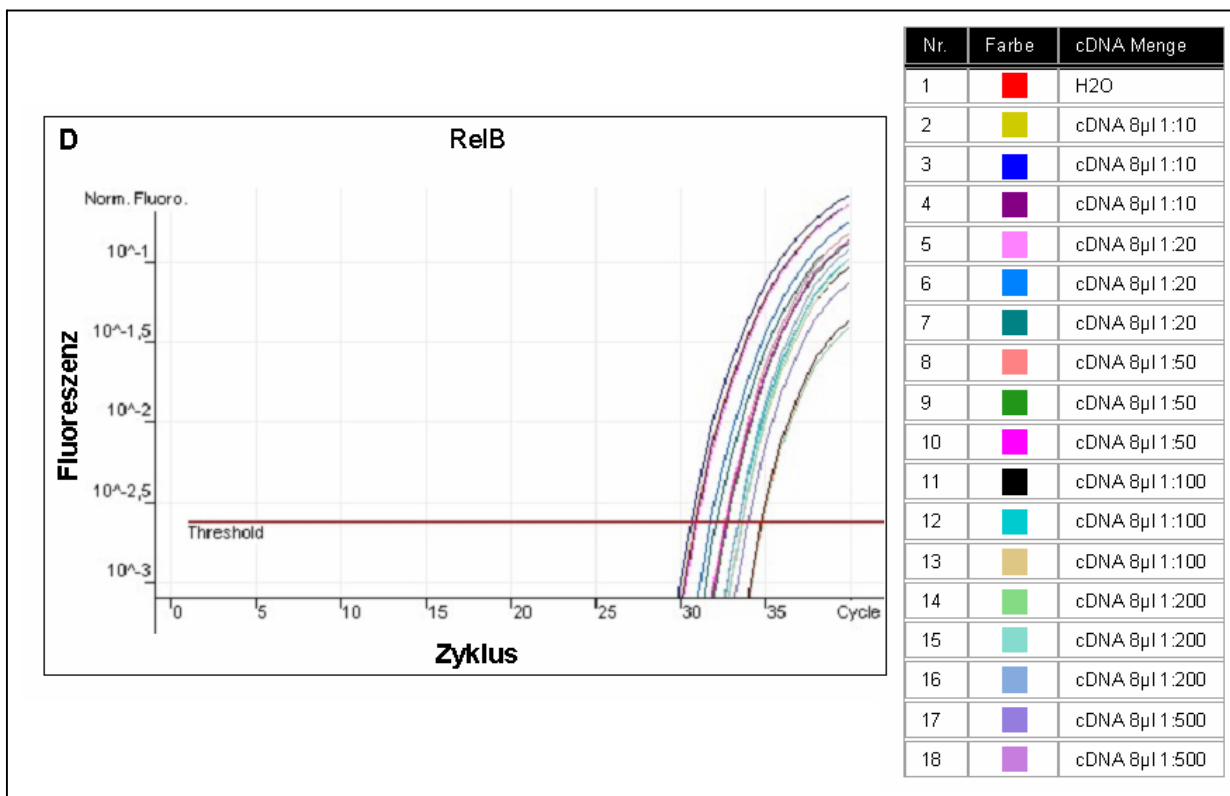
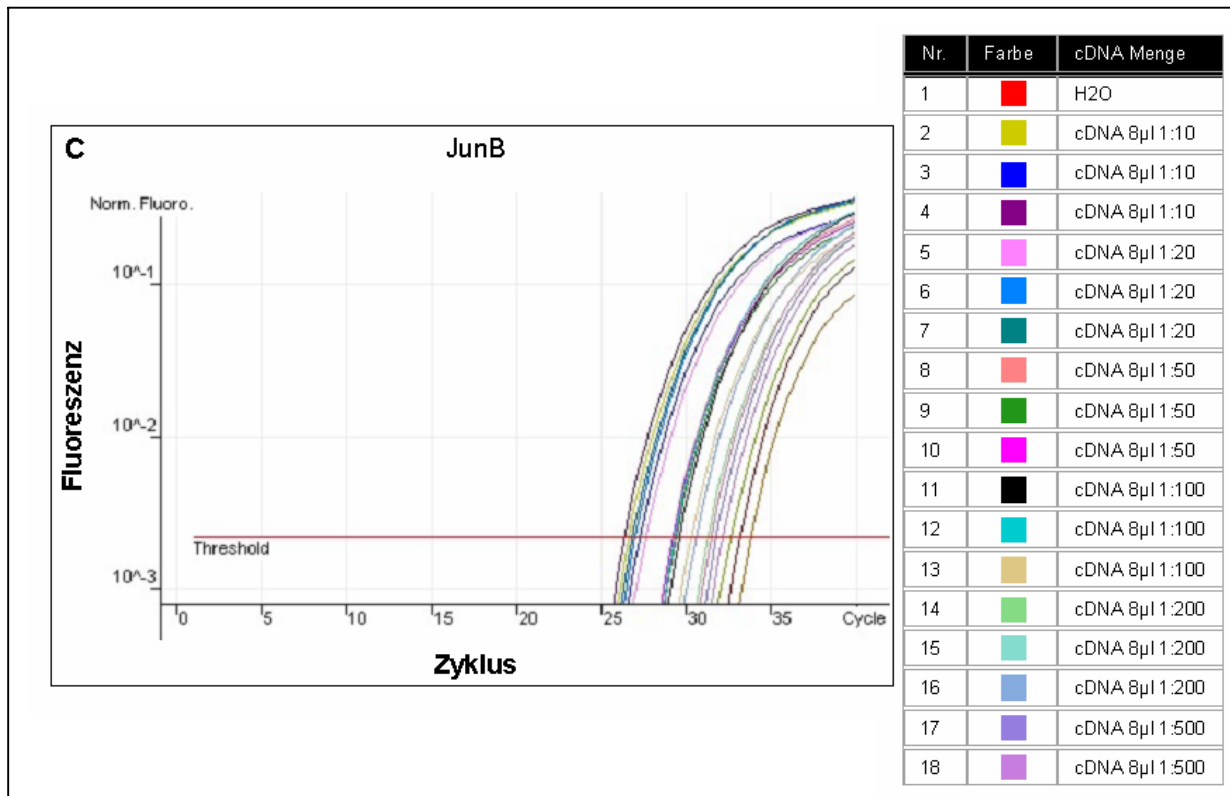
Die mRNA-Quantifizierung erfolgte durch die relative Standardkurven-Methode, die eine relative Quantifizierung eines Zielsequenz-Transkripts und den Vergleich zwischen unterschiedlichen Proben bzw. Versuchsbedingungen ermöglicht. Durch diese Methode können jedoch keine Aussagen über die absoluten mRNA-Mengen gemacht werden.

3.2.2.2.1. Standardkurven der Zielgene und GAPDH

Zur relativen Quantifizierung der spezifischen Zielgene wurden zuerst quantitative PCR-Reaktionen mit exakten Verdünnungen des Standards durchgeführt. Die experimentell ermittelte Größe bei der quantitativen RT-PCR ist der C_T -Wert. Er wird für jede Probe eines PCR-Laufes bestimmt. Der C_T -Wert gibt den Zyklus der PCR an, in dem das Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert überschreitet. Dieser Schwellenwert gilt für alle Proben eines PCR-Laufes und befindet sich am Ende des ersten Drittels der exponentiellen Amplifizierungs-Phase. Er wird für jeden PCR-Lauf manuell eingegeben. Aus den C_T -Werten dieser PCRs wurden Standardkurven für jedes Zielgen und für GAPDH angefertigt (siehe Abbildung 49). Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist die endogene Kontrolle oder das housekeeping-gene, dessen Expression sich unter den Versuchsbedingungen nicht ändert. Bei der Erstellung der Standardkurven wurde für alle PCR-Reaktionen die identische cDNA als Standard in Verdünnungsschritten zwischen 1:10 und 1:500 verwendet. Bei der Standardkurve von Bcl-XL wurde die cDNA zwischen 1:5 und 1:10000 verdünnt. Um Auswirkungen der Schwankungen im C_T -Wert auf die Regressionsgleichung der Standardkurve zu verringern, wurden stets 3 Ansätze pro Verdünnung durchgeführt. In Abbildung 48 sind die PCR-Reaktionen der Verdünnungsreihen für die jeweiligen Gene durch Auftragung des logarithmischen Fluoreszenzsignals gegen die Zykluszahl dargestellt. Die Basislinie zu Beginn der PCR ist nicht zu sehen, da sie nur etwas über dem Nullwert liegt. Die anschließende exponentielle Phase, in der das Amplifikat in jedem Zyklus verdoppelt wird, zeigt einen raschen Anstieg des Fluoreszenzsignals um den Faktor 2^n (mit n = Zykluszahl). Danach gehen alle PCR-Reaktionen in die Plateauphase über, in der das Signal nicht mehr zunimmt. Der Schwellenwert, der die Kurven im C_T -Wert

schneidet, markiert etwa das Ende des ersten Drittels des exponentiellen Anstiegs und ist in allen in Diagrammen (A) – (F) als rote Linie mit der Beschriftung *Threshold* zu erkennen.





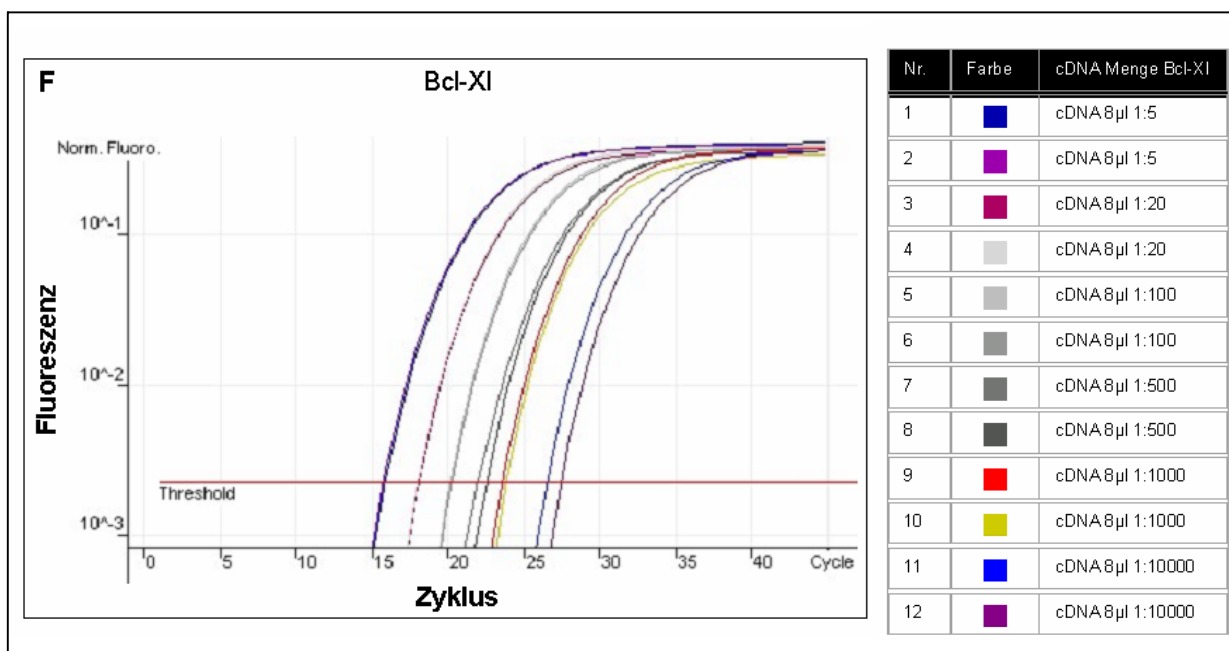
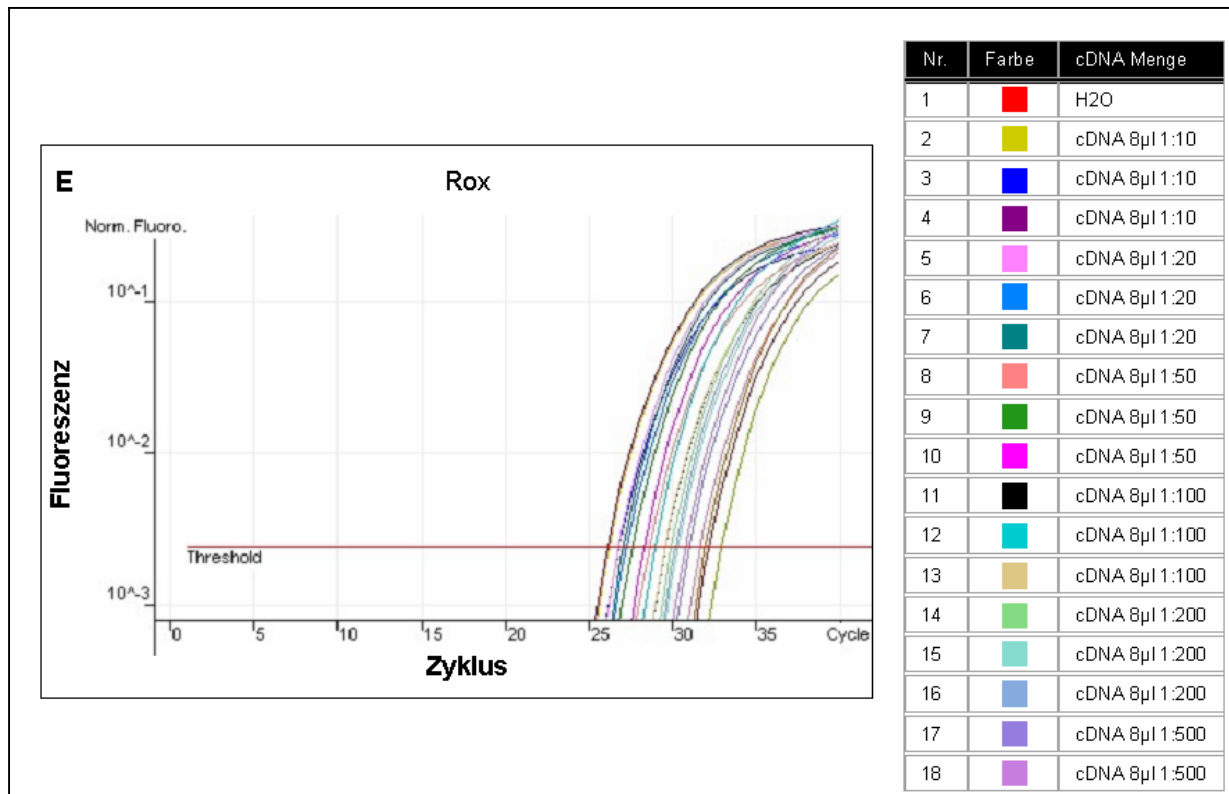
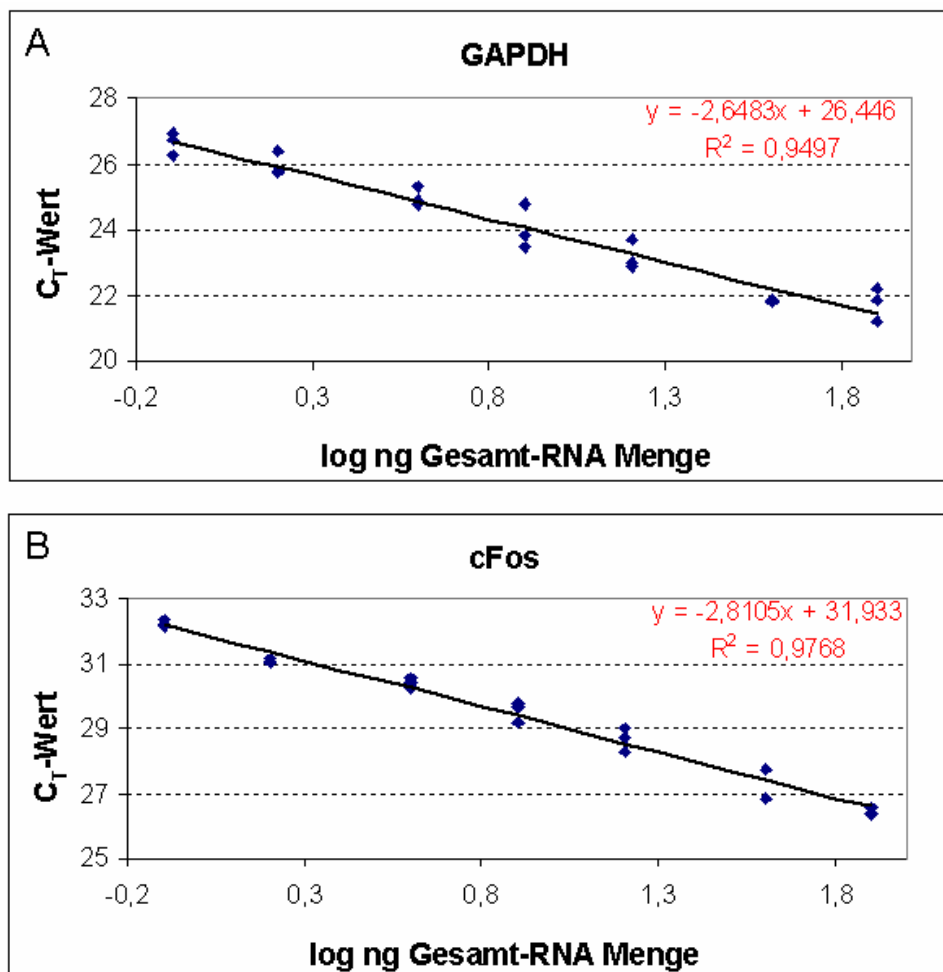
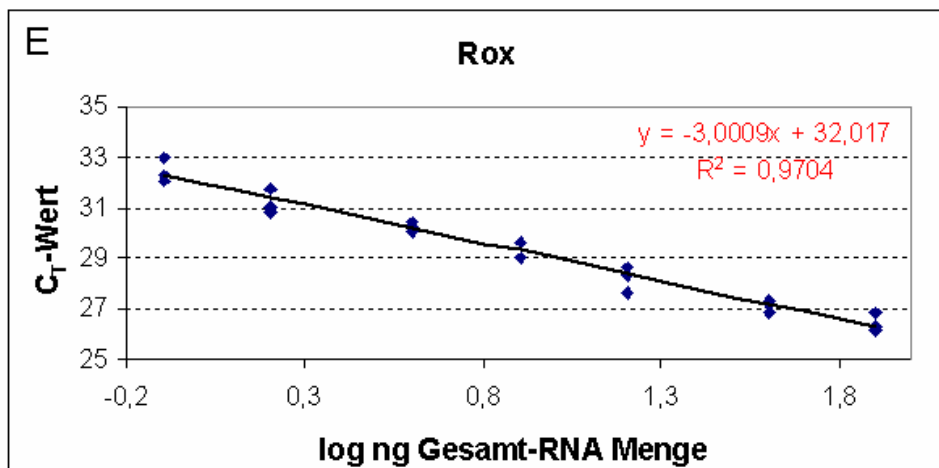
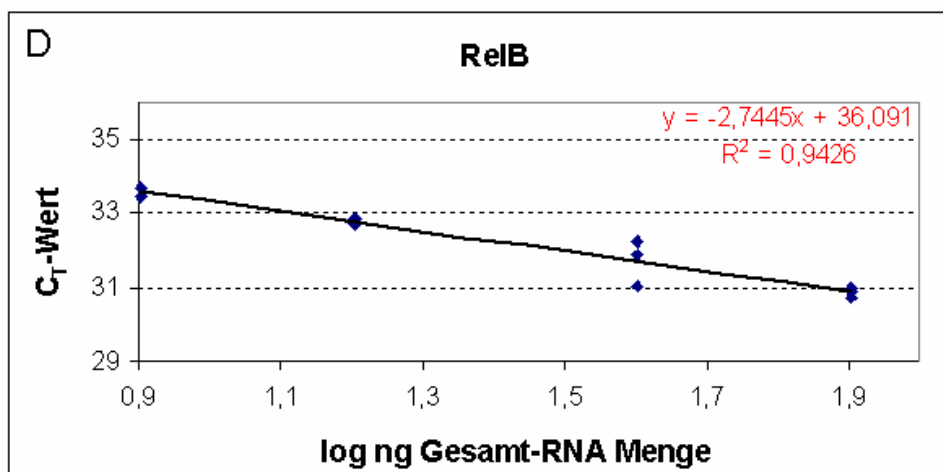
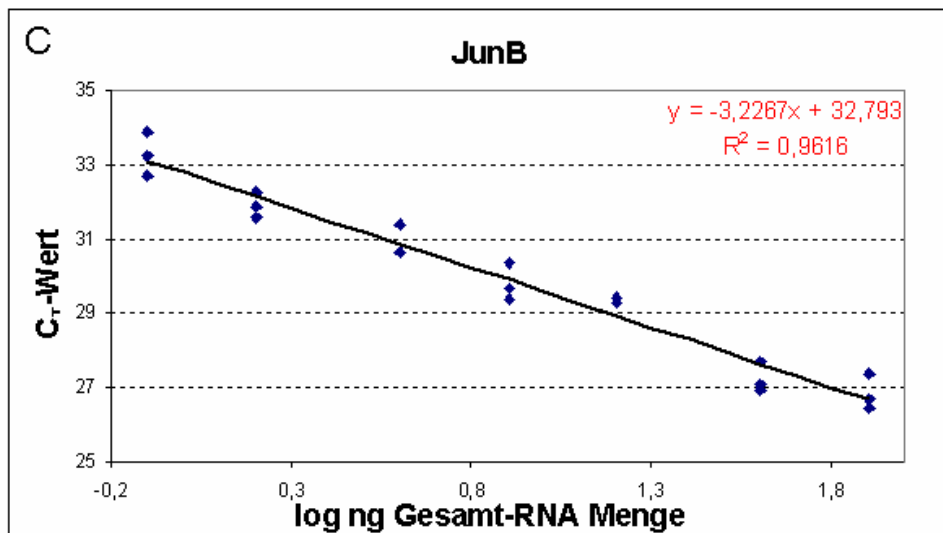


Abbildung 48: Quantitative PCR zur Ermittlung der Standardkurven. Für alle Standardkurven wurde die identische cDNA als Template verwendet. Primer gegen (A) GAPDH, (B) cFos, (C) JunB, (D) RelB, (E) Rox und (F) Bcl-X_L amplifizieren je ein spezifisches PCR-Produkt. Diagramm links zeigt jeweils den Logarithmus des Fluoreszenzsignals (Y-Achse) bei zunehmender Zykluszahl (X-Achse) der quantitativen PCR. Tabelle rechts gibt für jede Kurve im Diagramm die Verdünnung und das Volumen der eingesetzten cDNA an.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden die C_T -Werte der quantitativen PCR der Standardverdünnungen auf die Y-Achse gegen den Logarithmus der Gesamt-RNA Menge auf der X-Achse aufgetragen. Die Gesamt-RNA-Menge ist die Menge an RNA, aus der die eingesetzte cDNA-Menge bei der reversen Transkription synthetisiert worden ist. Da die Quantität des Zielgenes später durch die Quantität der endogenen Kontrolle dividiert wird, fällt die Einheit der Standardkurve weg. Deshalb kann jede RNA oder cDNA als Standard verwendet werden, auch wenn die genaue Konzentration nicht bekannt ist. Wichtig ist nur, dass der identische Standard für Zielgen und endogene Kontrolle verwendet wird, die relativen Verdünnungen des Standards bekannt sind und exakt eingehalten werden. Deshalb kann eine theoretische Menge an Gesamt-RNA auf der Abszisse aufgetragen werden [19]. Durch die Punkte des X/Y-Graphen wird eine Regressionsgerade gelegt - diese entspricht der Gleichung der Standardkurve mit der allgemeinen Formel $y = m \cdot x + b$ (siehe Abbildung 49).





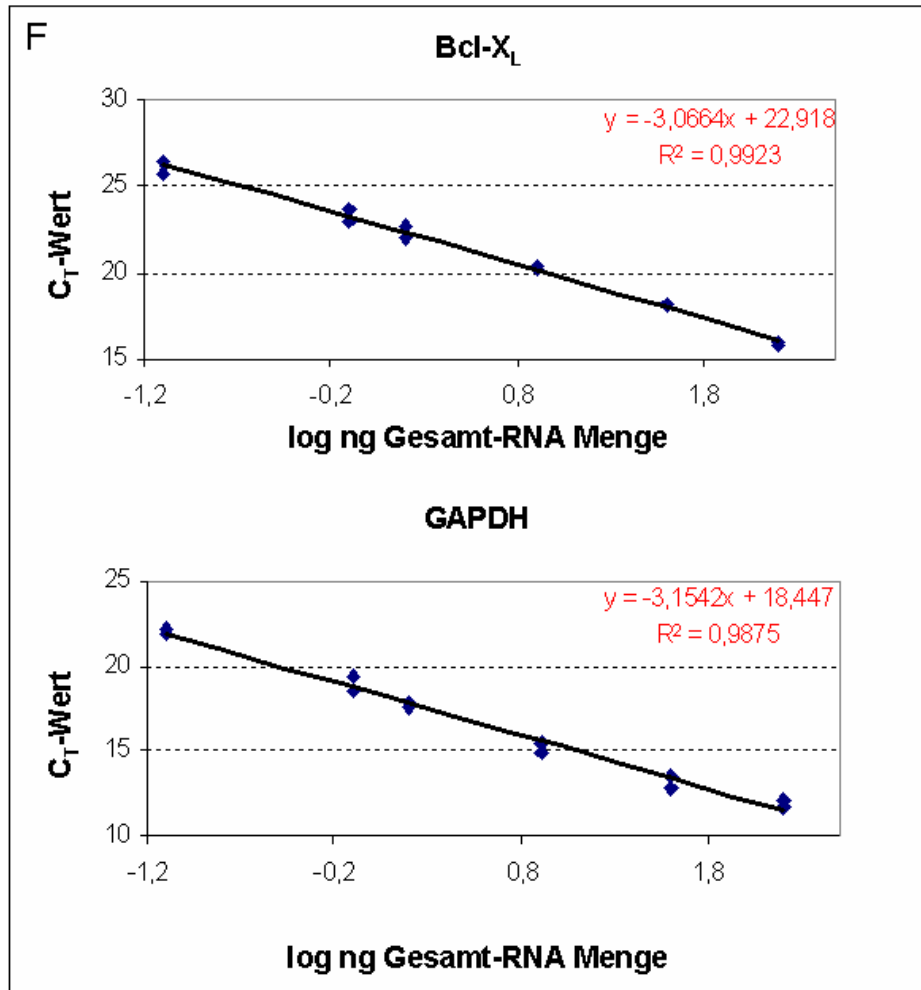


Abbildung 49: Standardkurven und Regressionsgleichungen der Zielgene und GAPDH. Auftragung der C_T-Werte der quantitativen PCR der Standardverdünnungen auf der Y-Achse gegen den Logarithmus der eingesetzten Nukleinsäuremenge auf der X-Achse. Regressionsgerade durch die Punkte gibt die Gleichung der Standardkurve an (rot, rechts oben). **(A)** Standardkurve von GAPDH, **(B)** Standardkurve von cFos, **(C)** Standardkurve von JunB, **(D)** Standardkurve von RelB, **(E)** Standardkurve von Rox, **(F)** Standardkurve von Bcl-X_L und GAPDH.

3.2.2.2.2. Quantitativer PCR-Lauf

Für jede Stimulation wurden zwei PCR-Reaktionen in separaten Reaktionsgefäßen durchgeführt, wobei im ersten die Zielsequenz, im zweiten die endogene Kontrollsequenz GAPDH amplifiziert wurde. Um Pipettierungenauigkeit und Schwankungen in den PCR-Reaktionen abzuschwächen, wurden alle PCR-Reaktionen im Doppel angesetzt. In Abbildung 50 wird exemplarisch eine quantitative RT-PCR (A/B) mit Angabe der C_T-Werte (C) und Darstellung der Schmelzkurve (D) der Gene RelB, cFos und GAPDH gezeigt.

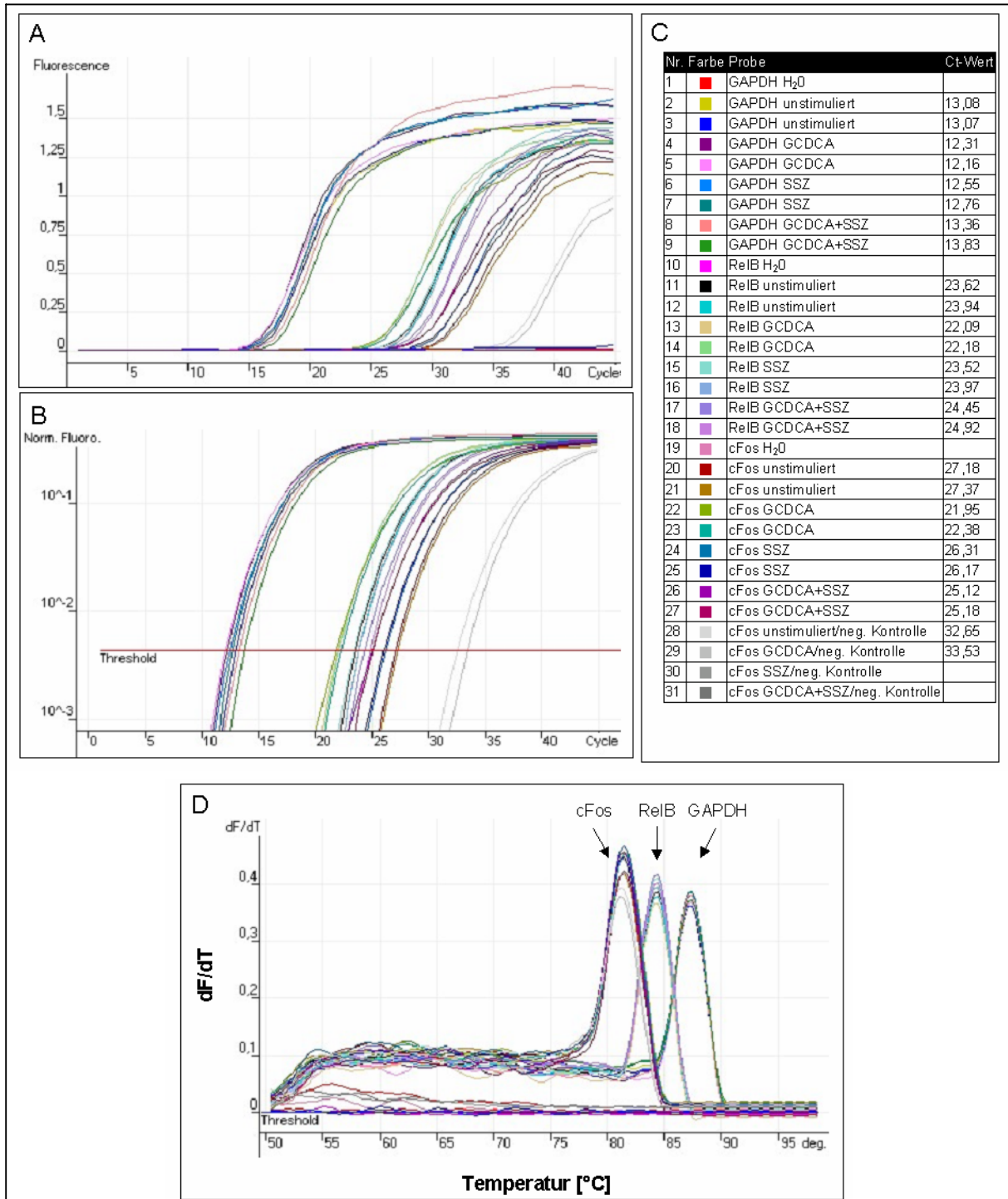


Abbildung 50: Quantitative PCR. (A) Analyse des PCR-Laufes. Fluoreszenzsignal (Y-Achse) ist gegen die Zykluszahl (X-Achse) aufgetragen. **(B)** Analyse des PCR-Laufes. Logarithmus des Fluoreszenzsignals (Y-Achse) ist gegen die Zykluszahl (X-Achse) aufgetragen. Rote Linie parallel zur X-Achse ist Schwellenwert (Threshold). Schnittpunkt mit einzelnen Kurven gibt C_T-Wert an. **(C)** Auflistung der Proben und Zuordnung zu den Kurvenfarben in (A), (B) und (D). Angabe der C_T-Werte. Bei Proben 28 – 31 (Negativ-Kontrolle) wurde keine Reverse Transkriptase bei der cDNA-Synthese zugegeben. **(D)** Schmelzkurve der Amplifikate am Ende der PCR. Jedes Amplifikat zeigt andere Schmelzeigenschaften, gleichmäßige Peaks zeigen Reinheit des PCR-Produktes an. Erster Peak entspricht cFos, zweiter RelB und letzter GAPDH.

Zur Überprüfung von Reinheit und Spezifität des PCR-Amplifikats wurden die Proben durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Analyse des Agarosegels zeigt nur eine Bande mit der erwarteten Größe. Primer-Dimere traten nicht auf (siehe Abbildung 51). Das gemessene Fluoreszenzsignal resultiert ausschließlich aus dem Zielamplifikat. Die C_T -Werte dieser PCR können zur Quantifizierung verwendet werden.

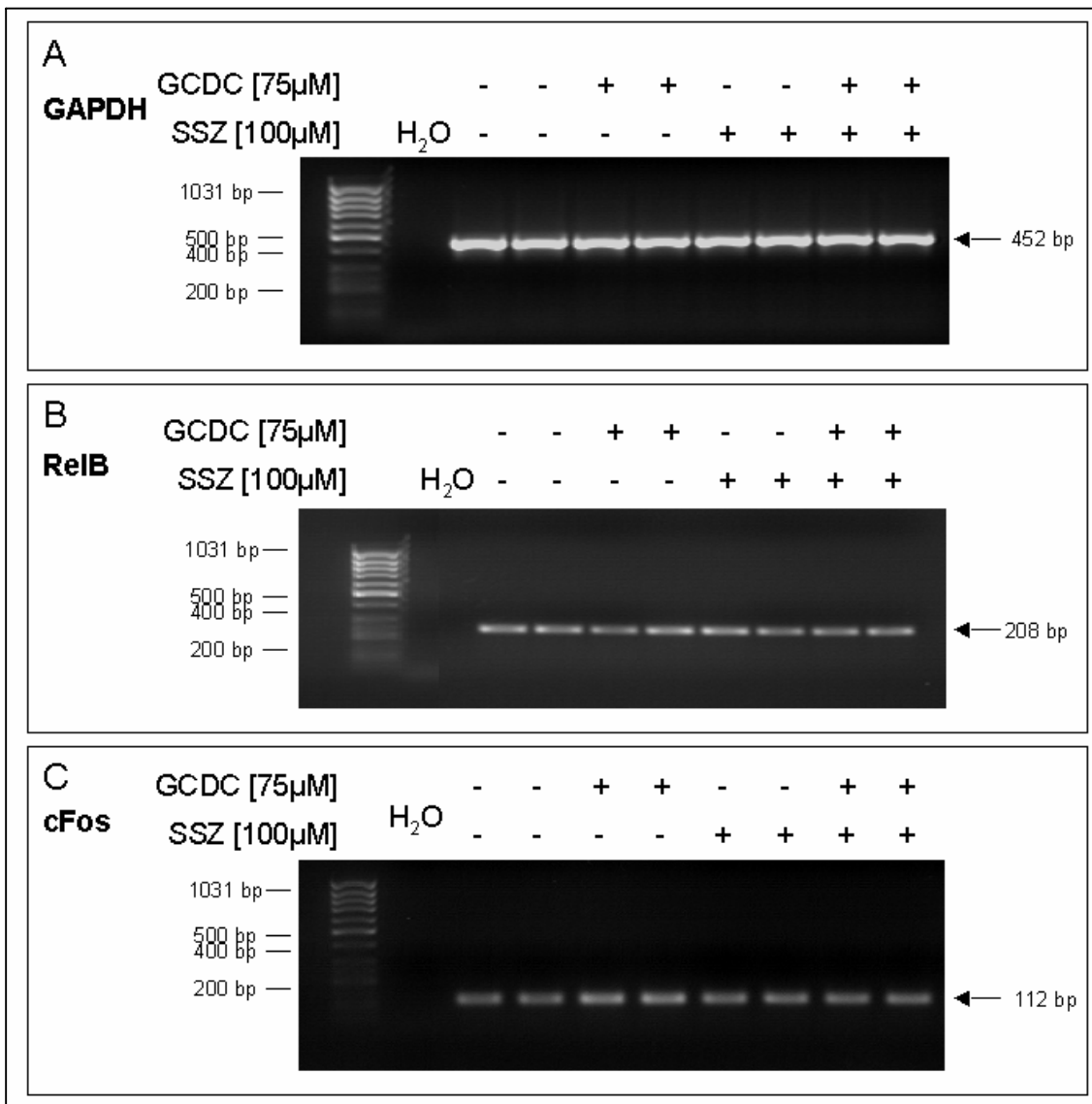


Abbildung 51: Agarosegelelektrophorese nach quantitativer RT-PCR. Agarosegele mit aufgetrennten Proben der in Abbildung 50 exemplarisch gezeigten quantitativen RT-PCR. **(A)** Amplifikate der GAPDH-Primer, **(B)** Amplifikate der RelB-Primer, **(C)** Amplifikate der cFos-Primer. Alle Proben weisen hohe Spezifität, keine Primer-Dimere und die errechnete Größe auf. H₂O dient als Kontaminationskontrolle.

3.2.2.2.3. Quantifizierung

Zur Quantifizierung wurde die relative Standardkurven-Methode angewendet. Man erhält damit keine Aussage über absoluten Mengen, aber eine exakte, relative Quantifizierung der Zielsequenz in unterschiedlich stimulierten Proben.

Bei der relativen Standardkurven-Methode werden die C_T -Werte der Zielsequenz und der endogenen Kontrolle in die Regressionsgleichung der ermittelten Standardkurve eingesetzt.

Die Regressionsgleichung der Standardkurve in der allgemeinen Form lautet:

$$y_S = m_S \cdot x_S + b_S$$

Mit $y_S = C_T$ -Wert der Standardverdünnung

$x_S = \log$ Gesamt-RNA in der Standardverdünnung

$m_S =$ Steigung der Geraden

$b_S =$ Schnittpunkt mit der Y-Achse

Der C_T -Wert der PCR-Probe wird in die Regressionsgleichung eingesetzt, um x , den Logarithmus der in der unbekanntenen Probe vorhandenen RNA-Menge, zu errechnen.

$$x = (C_T - b_S) / m_S$$

Mit $x = \log$ RNA in der Probe

$C_T = C_T$ -Wert der Probe

$m_S =$ Steigung der Regressionsgeraden

$b_S =$ Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse

Die vorhandene Menge an RNA a in der Probe erhält man durch Potenzieren des Exponenten x mit der Basis 10.

$$a = 10^x$$

Mit $a =$ RNA in der Probe

$x = \log$ Gesamt-RNA in der Probe

Für jeden C_T -Wert einer Probe wird a , die vorhandene Menge an RNA, sowohl für das Zielgen als auch für GAPDH ermittelt. Anschließend wird der Mittelwert a_M aller einzelnen PCR-Reaktionen für eine Stimulation und dasselbe Gen errechnet.

$$a_M = (a_1 + a_2 + \dots + a_n) / n$$

Da die RNA-Menge der endogenen Kontrolle GAPDH unter den Stimulationsbedingungen konstant ist, werden die RNA-Mengen der Zielsequenz durch die GAPDH-RNA-Mengen in der identischen Probe durch Division normalisiert. Die Einheit wird dadurch weggekürzt.

$$a_{ZN} = a_{MZ} / a_{MGAPDH}$$

Mit a_{ZN} = normalisierte Menge Zielsequenz

a_{MZ} = Mittelwert Menge Zielsequenz

a_{MGAPDH} = Mittelwert Menge GAPDH

Um die Mengen einer Zielsequenz unter verschiedenen Stimulationen vergleichen zu können, wird für jede Stimulation a_{ZN} bestimmt. Danach wird eine Stimulation, z.B. die nicht stimulierten Zellen, als Kalibrator ausgewählt. Jede normalisierte Menge der Zielsequenz a_{ZN} wird durch die normalisierte Menge des Kalibrators a_{ZNK} geteilt. Der Kalibrator erhält den Wert 1; alle anderen Stimulationen ein n-faches des Kalibrators. Die relativen Quantifizierungen der Gene cFos, JunB, RelB, Rox und Bcl-X_L mit der unstimulierten Probe als Kalibrator lieferten die in Abbildung 52 bis Abbildung 56 ersichtlichen Werte.

Den ausgeprägtesten Effekt auf die Transkription hatten 75 μ M GCDCA bei cFos, einer Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1. 4h Inkubation von HepG2-Ntcp Zellen mit 75 μ M GCDCA steigerte die Transkription von cFos um das 31,4-fache. 100 μ M Sulfasalazin allein beeinflussten die Transkriptionsrate von cFos nicht; zusammen mit GCDCA schwächte es allerdings den GCDCA-vermittelten Anstieg um 77%, auf nur noch das 7-fache der unstimulierten Zellen, ab (siehe Abbildung 52).

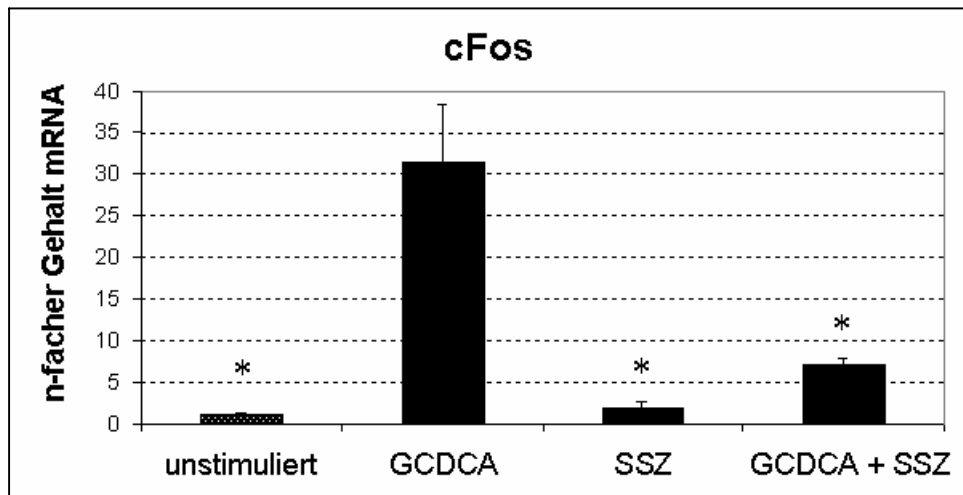


Abbildung 52: Quantifizierung von cFos. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit Trägermedium (Kontrolle) oder mit 75 μM GCDCA in An- und Abwesenheit von 100 μM Sulfasalazin (SSZ) inkubiert. Isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Diese wird als Template bei der quantitativen RT-PCR verwendet. Quantifizierung von cFos durch relative Standardkurvenmethode mit GAPDH als endogene Kontrolle. Unstimulierte Zellen wurden als Kalibrator gleich 1 gesetzt. (MW \pm SD, * $p < 0,05$ vgl. GCDCA nach LSD, $n = 3$, zwei unabhängige Stimulationen und RNA-Isolationen)

Einen ebenfalls signifikanten Anstieg der Transkriptionsrate des JunB-Gens auf das 4-fache induzierte 75 μM GCDCA gegenüber nicht stimulierten oder mit 100 μM SSZ stimulierten Zellen. Gleichzeitige Stimulation mit 100 μM SSZ verringerte den Anstieg nicht signifikant um 15% auf das 3,5-fache der nicht stimulierten Zellen (siehe Abbildung 53).

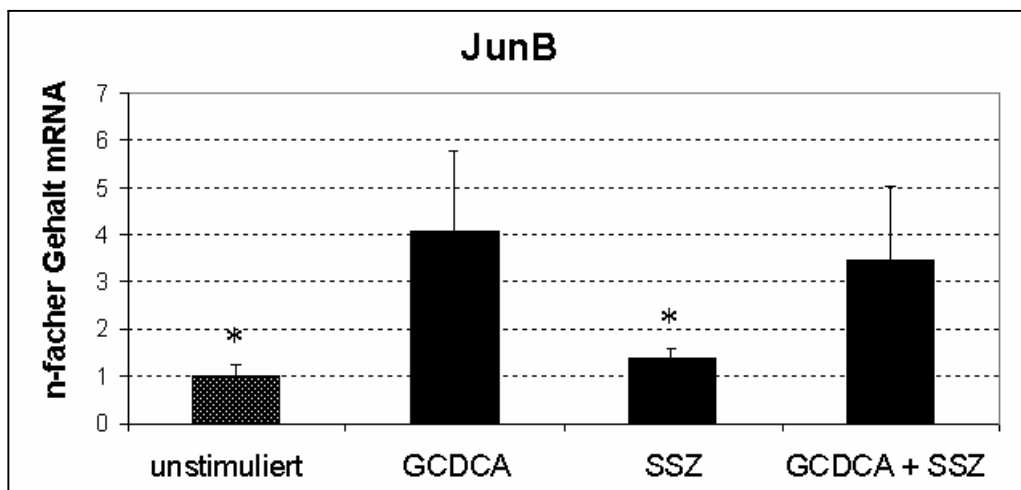


Abbildung 53: Quantifizierung von JunB. Nach der angegebenen Stimulation für 4h wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Quantitative RT-PCR mit Quantifizierung von JunB durch die relative Standardkurvenmethode mit GAPDH als endogene Kontrolle. Unstimulierte Zellen wurden als Kalibrator gleich 1 gesetzt. (MW \pm SD, * $p < 0,05$ vgl. GCDCA nach LSD, $n = 3$, zwei unabhängige Stimulationen und RNA-Isolationen)

RelB, ein Transkriptionsfaktor, der NF- κ B inhibieren kann, erfuhr eine signifikante Steigerung der Transkription auf das 1,8-fache der nicht stimulierten Zellen nach GCDCA-Stimulation. 100 μ M SSZ allein oder in Kombination mit GCDCA verringerte die Transkription diese Gens auf einen Wert, der 20% niedriger als der der nicht stimulierten Zellen ist (siehe Abbildung 54).

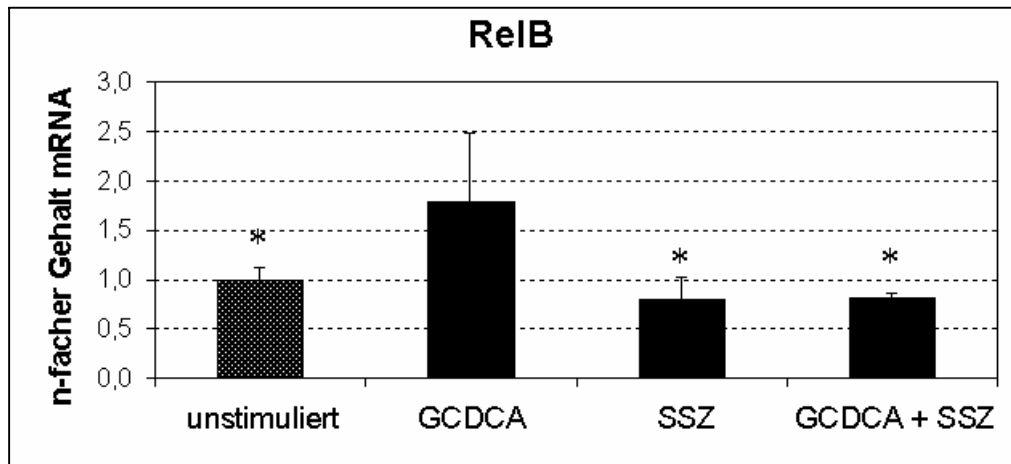


Abbildung 54: Quantifizierung von RelB. Reverse Transkription der Gesamt-RNA aus 4h mit 75 μ M GCDCA in An- und Abwesenheit von 100 μ M SSZ inkubierten oder nicht stimulierten HepG2-Ntcp Zellen. Quantifizierung von RelB durch quantitative RT-PCR mit der relativen Standardkurvenmethode und GAPDH als endogene Kontrolle. Unstimulierte Zellen wurden als Kalibrator gleich 1 gesetzt. (MW \pm SD, * $p < 0,05$ vgl. GCDCA nach LSD, $n = 3$, zwei unabhängige Stimulationen und RNA-Isolationen)

Die Modulation der Transkription von Rox durch GCDCA, SSZ oder beidem gleichzeitig war nicht signifikant erhöht gegenüber nicht stimulierten Zellen. GCDCA steigerte die Transkription auf das 2,2-fache, 100 μ M SSZ auf das 1,6-fache und GCDCA mit SSZ zusammen auf das 2,4-fache gegenüber nicht stimulierten Zellen (siehe Abbildung 55).

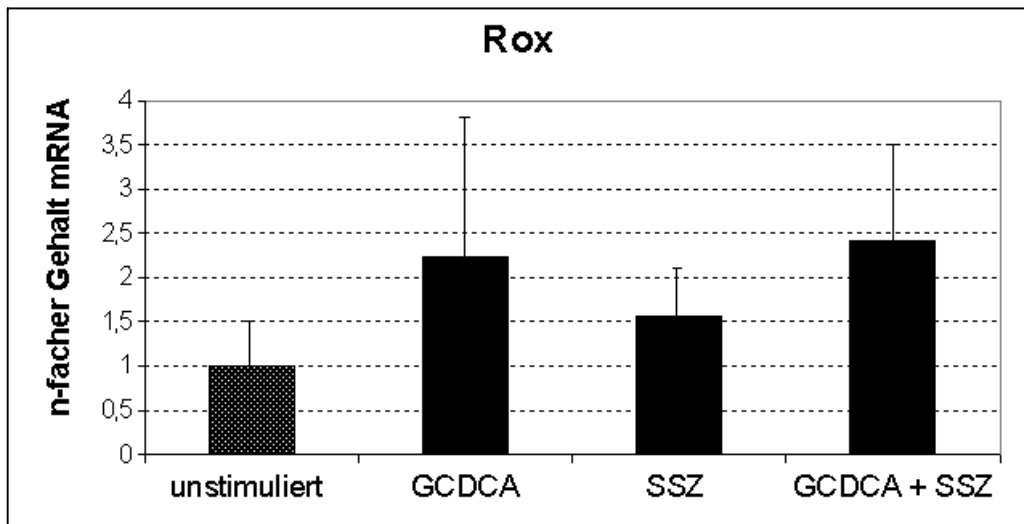


Abbildung 55: Quantifizierung von Rox. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit 75 μM GCDCA in An- und Abwesenheit von 100 μM Sulfasalazin (SSZ) inkubiert oder nicht stimuliert. Isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Diese wird als Template bei der quantitativen RT-PCR verwendet. Quantifizierung von Rox durch die relative Standardkurvenmethode mit GAPDH als endogene Kontrolle. Unstimulierte Zellen wurden als Kalibrator gleich 1 gesetzt. (MW \pm SD, n = 3, zwei unabhängige Stimulationen und RNA-Isolationen)

Die Transkription des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins Bcl-X_L wird durch SSZ allein oder in Kombination mit GCDCA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht verändert. GCDCA reduzierte die Transkriptionsrate im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant um 41,3 \pm 20,6 % auf das 0,58-fache (siehe Abbildung 56).

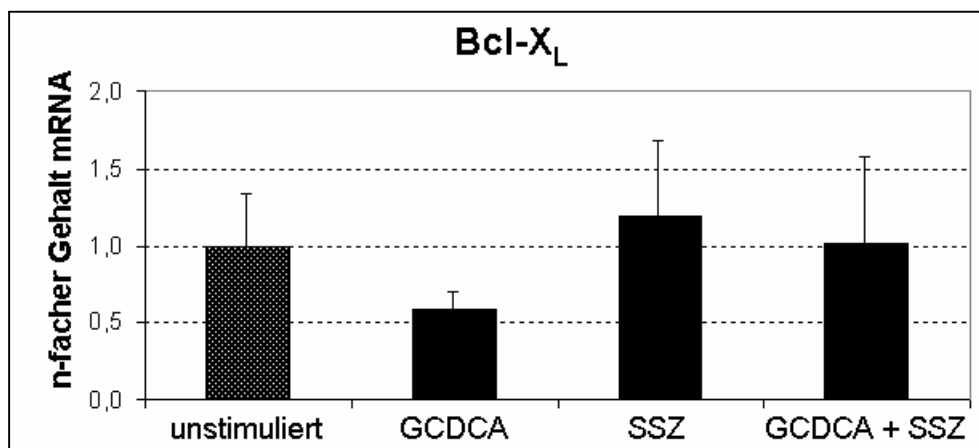


Abbildung 56: Quantifizierung von Bcl-X_L. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit 75 μM GCDCA in An- und Abwesenheit von 100 μM Sulfasalazin (SSZ) inkubiert oder nicht stimuliert. Isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Diese wird als Template bei der quantitativen RT-PCR verwendet. Quantifizierung von Bcl-X_L durch die relative Standardkurvenmethode mit GAPDH als endogene Kontrolle. Unstimulierte Zellen wurden als Kalibrator gleich 1 gesetzt. (MW \pm SD, n = 3, zwei unabhängige Stimulationen und RNA-Isolationen)

3.2.3. Einfluss von GCDCA auf die Expression von Bcl-X_L

Nachdem die quantitative RT-PCR keine signifikante Reduktion der Bcl-X_L mRNA nach Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit 75 µM GCDCA nachgewiesen hat, wurde der Einfluss der Gallensäure auf die Expression dieses Gens untersucht. Eine tendenzielle Reduktion des mRNA-Gehaltes war bereits nach 4h Inkubation mit GCDCA zu beobachten. Eine Veränderung des Proteingehaltes kann aber erst nach Abbau des vor der Inkubation vorhandenen Proteins zu sehen sein. Untersuchungen der Halbwertszeiten von unterschiedlichen Proteinen zeigten, dass Bcl-X_L zu den stabilsten zählt und nach 6h bzw. 12h die Halbwertszeit noch nicht erreicht ist [96], [187]. Deshalb wurden Langzeitstimulationen von 4h bis 41h mit den HepG2-Ntcp Zellen durchgeführt. Die Auswirkungen der GCDCA Stimulation auf den Bcl-X_L Proteingehalt war gering. Nach 17h war meist eine schwache Reduktion des Bcl-X_L-Gehalts um maximal 20% der 4h nicht stimulierten Zellen erkennbar. Zu allen anderen Zeitpunkten lag der Bcl-X_L Gehalt geringfügig über dem der 4h nicht stimulierten Zellen. Der direkte Vergleich der nicht stimulierten mit den GCDCA stimulierten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten zeigte, dass der Bcl-X_L Gehalt in den mit Gallensäuren stimulierten Zellen nach 17h, 24h und 41h nicht signifikant verringert war (siehe Abbildung 57).

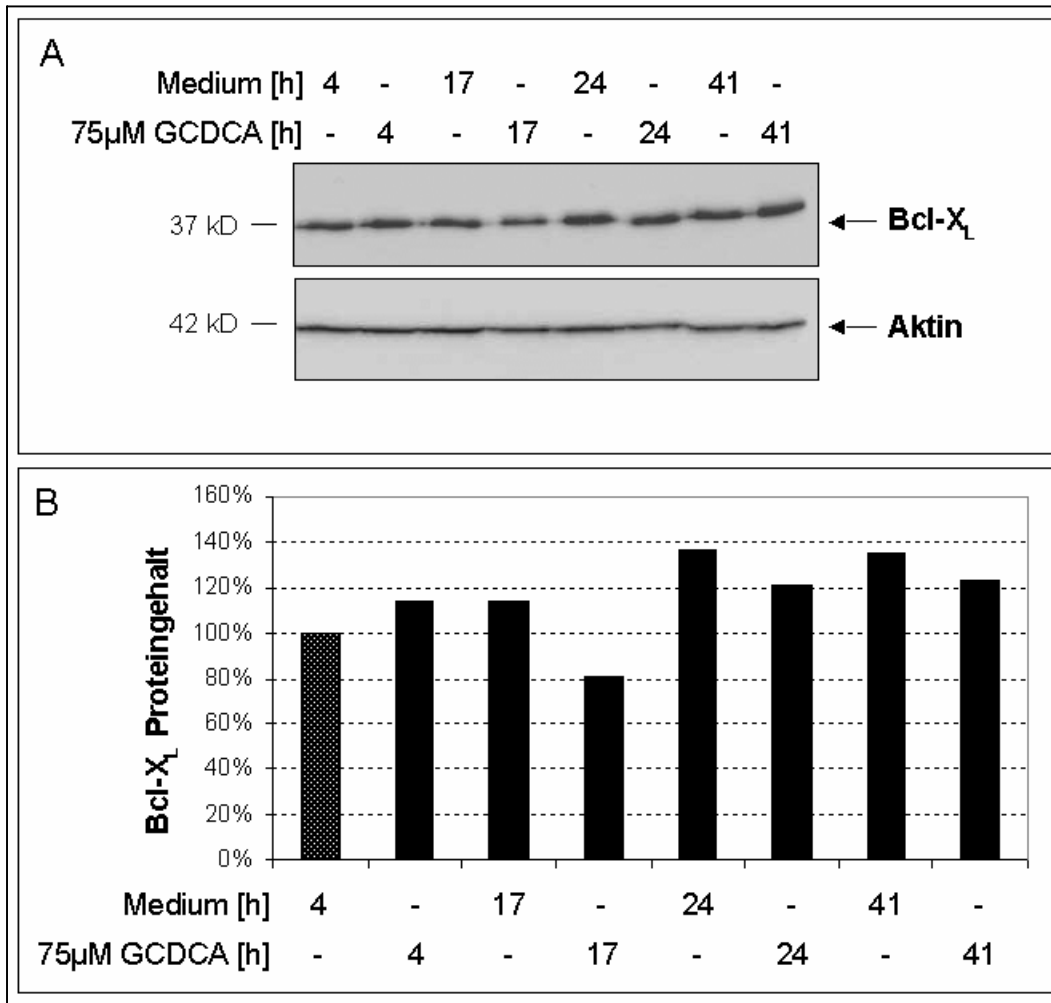


Abbildung 57: Analyse des Bcl-X_L Proteingehalts nach 4h - 41h Stimulation mit GCDCA. HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h, 17h, 24h und 41h mit MEM-Medium, das keine Zusätze enthält, oder 75 µM GCDCA inkubiert. **(A)** Nachweis des Bcl-X_L Proteins durch Western-Blot aus Gesamtzelllysaten. Ladungskontrolle durch Strippen der Membran und Inkubation mit Aktin-Antikörper. **(B)** Densitometrische Auswertung des Bcl-X_L Western-Blots. Die 4h nicht stimulierte Probe wurde auf 100% normiert.

Da GCDCA kaum einen Effekt auf die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L zeigte, wurde der Einfluss der TUDCA (Tauroursodeoxycholsäure) untersucht. Diese Gallensäure kann die GCDCA-vermittelte Apoptose hemmen. Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit einer der Gallensäuren GCDCA und TUDCA in 75 µM Konzentration oder mit beiden gleichzeitig modulierte den Bcl-X_L Gehalt der Zelle ebenfalls kaum (siehe Abbildung 58). Nach 17h, 24h und 40h schwankte die Expression von Bcl-X_L unabhängig von der Stimulation mit GCDCA bzw. TUDCA allein oder beiden Gallensäuren simultan um den Wert der nicht stimulierten Probe. Die Intensität der Bcl-X_L-Bande im Western-Blot wurde weder durch GCDCA noch durch TUDCA mit einer Inkubationszeit von 17h bis 40h signifikant verändert.

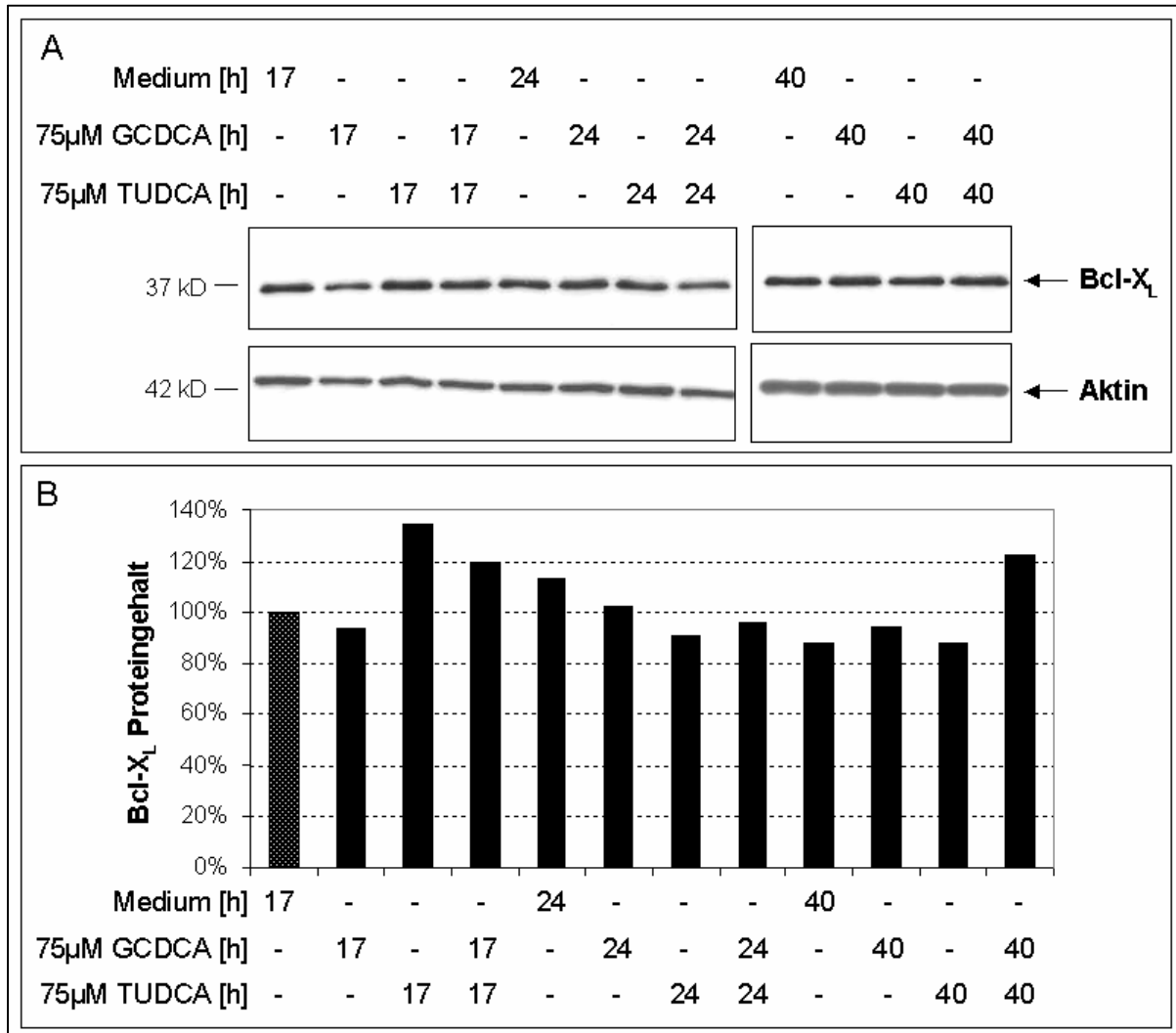


Abbildung 58: Einfluss von GCDCA und TUDCA auf den Bcl-X_L Proteingehalt. HepG2-Ntcp Zellen wurden 17h, 24h und 40h mit je 75 μ M GCDCA, TUDCA oder beidem gleichzeitig inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen nicht stimuliert, indem sie in MEM-Medium ohne Zusätze kultiviert wurden. **(A)** Western-Blot aus Gesamtzelllysaten mit primärem Antikörper gegen Bcl-X_L zeigt Proteingehalt von Bcl-X_L an. Strippen der Membran und Inkubation mit Aktin-Antikörper dient als Ladungskontrolle. **(B)** Densitometrische Auswertung der Western-Blots gegen Bcl-X_L und Aktin. Der Bcl-X_L Proteingehalt ist auf den Gesamtproteingehalt durch Vergleich mit der Aktinbande abgeglichen. 17h nicht stimulierte Probe auf 100% normiert.

3.2.4. Die Modulation von AP-1 während der GCDCA-vermittelten Apoptose

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist in vielfältige zelluläre Prozesse, wie etwa Proliferation, Transformation, Differenzierung oder Zelltod, involviert. Obwohl er zu den früh entdeckten Transkriptionsfaktoren in Säugern zählt, sind weder seine physiologischen Funktionen noch seine Regulation vollständig entschlüsselt. AP-1 ist kein einzelnes Protein, sondern besteht aus einem Dimer, das sich aus einer Vielzahl von Proteinen zusammensetzen kann. Alle diese Proteine weisen eine bZIP (*basic leucine zipper*)- Domäne auf und sind Mitglieder der Jun-, Fos-, Maf- oder ATF-Proteinfamilie. Jun Proteine sind in der Lage Homodimere zu bilden. Fos-Proteine können nur Heterodimere, meist zusammen mit den Jun-Proteinen, ausbilden [188]. Im Microarray zeigten die beiden Komponenten des AP-1 Komplexes cFos und JunB eine 4-fache bzw. 2,2-fache Erhöhung der Transkription durch GCDCA-Stimulation verglichen mit nicht stimulierten Zellen. Die Quantifizierung durch die RT-PCR ergab für cFos eine noch deutlichere Hochregulation der Transkription durch GCDCA auf das 31-fache. Für JunB wurde die Steigerung des mRNA-Gehaltes in GCDCA-stimulierten Zellen auf das 4-fache bestätigt.

Da beide Proteine zusammen einen AP-1 Komplex ausbilden können, wurde die Wirkung von GCDCA auf AP-1 und die Rolle von AP-1 bei der Gallensäuren-induzierten Apoptose untersucht.

3.2.4.1. Effekt von GCDCA auf die AP-1 Aktivität in HepG2-Ntcp Zellen

HepG2-Ntcp Zellen wurden 0,5h, 1h oder 2h mit 75 μ M GCDCA inkubiert. Die extrahierten Zellkernproteine wurden mit 32 P-markiertem Oligonukleotid inkubiert, das eine AP-1 Bindestelle aufweist, so dass vorhandene AP-1 Transkriptionskomplexe binden können. Anschließend wurden die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Nur Proteine, die an das AP-1 Oligonukleotid gebunden hatten, wurden durch die radioaktive Markierung detektiert. GCDCA erhöhte die Bindung von Proteinen an die AP-1 Bindestelle. Die Bindekapazität war nach 30 Min maximal, nach 1h immer noch deutlich über der Kontrolle der nicht stimulierten Zellen. Nach 2h erreichte die AP-1 Bindung etwa Kontrollniveau. 10nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

(PMA) ist ein bekannter, starker AP-1 Aktivator und dient als Kontrolle für die AP-1 Aktivierung. Inkubation von PMA stimulierten Kernextrakten mit markiertem Oligonukleotid, das eine mutierte AP-1 Bindestelle aufweist, verhinderte das Ausbilden der AP-1-Oligonukleotid-Komplexe (siehe Abbildung 59).

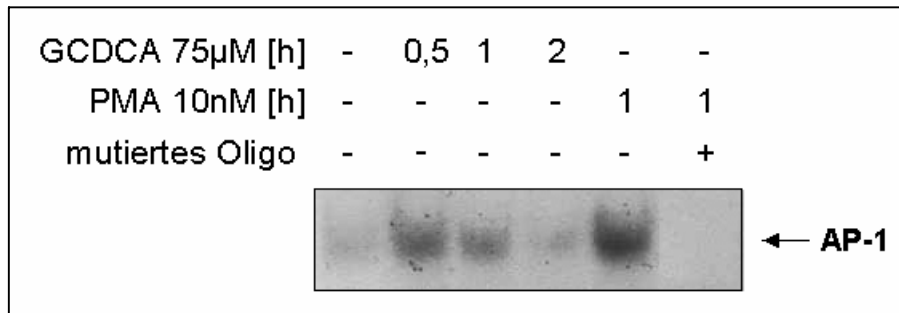


Abbildung 59: GCDCA induziert die Aktivierung von AP-1 im EMSA. HepG2-Ntcp Zellen wurden nicht stimuliert oder für die angegebenen Zeiten mit 75 µM GCDCA oder 10nM PMA inkubiert. Die Kernextrakte wurden mit radioaktiv markiertem AP-1-Oligonukleotid inkubiert. Als negative Kontrolle wurde Kernextrakt mit ³²P-markiertem Oligonukleotid inkubiert, das eine Mutation in der AP-1 Erkennungssequenz aufweist. Nach der Bindung an die radioaktiven Oligonukleotide wurden die Kernextrakte durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Schwärzen des Films detektiert.

Zur Messung der AP-1 Aktivität wurden HepG2-Ntcp Zellen mit dem Collagenase-*Firefly*-Luciferase und dem TK-*Renilla*-Luciferase-Plasmid cotransfiziert. Das Collagenase-*Firefly*-Luciferase-Plasmid enthält den Promotor des Collagenase-Gens, der eine AP-1 Bindestelle aufweist, *upstream* des Luciferase-Gens des Glühwürmchens *Photinus pyralis* (engl. *firefly*). Wenn aktive AP-1 Komplexe vorhanden sind, binden diese an den Collagenase-Promotor und induzieren die Transkription und Expression der *Firefly*-Luciferase. Das zweite Plasmid, TK-*Renilla*-Luciferase, besitzt den konstitutiv aktiven Promotor der Thymidinkinase (TK) *upstream* des Luciferase-Gens des Korallentierchens *Renilla reniformis*. Die Expression der *Renilla*-Luciferase ist vor allem von der Transfektionseffizienz abhängig. Für jede Probe wurden die Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase ermittelt und die Ratio aus beiden errechnet, um Schwankungen der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Proben auszugleichen. 10 µM GCDCA erhöhte tendenziell die AP-1 Aktivität nach 1h Inkubation der Zellen um 40 ± 27%. 75 µM GCDCA zeigten, wahrscheinlich wegen der Toxizität der Gallensäure, einen geringeren positiven Effekt auf die Aktivierung von AP-1 im Reporterassay als 10 µM GCDCA (Daten nicht gezeigt). 10nM PMA steigerte die AP-1 Aktivität um

$27 \pm 14\%$. Da die Aktivitäten der einzelnen Proben der gleichen Stimulationen stark schwankten, wurde keine Signifikanz erreicht (siehe Abbildung 60).

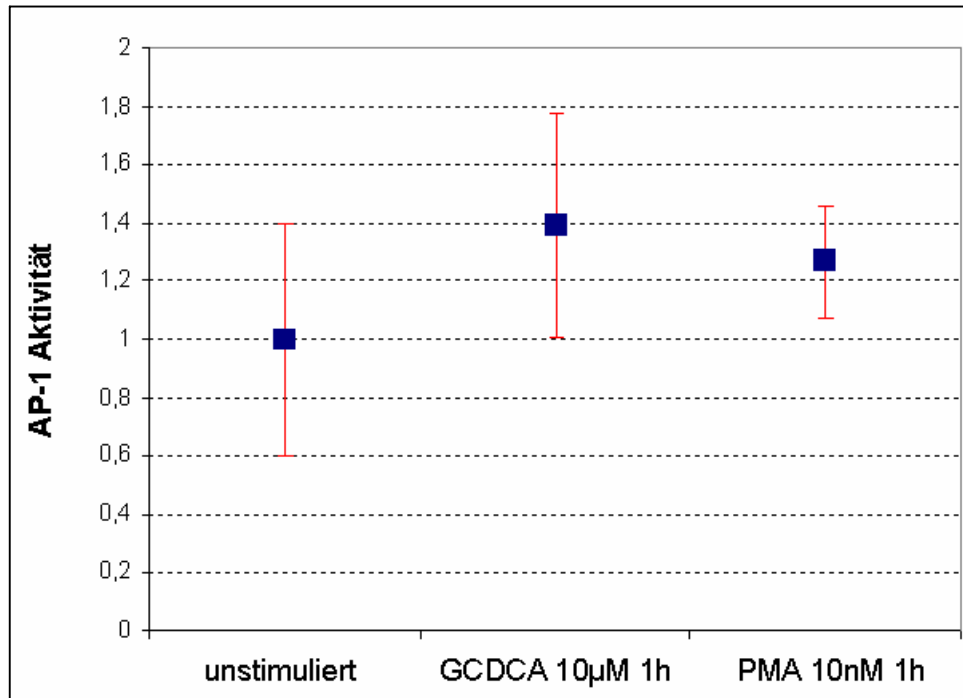


Abbildung 60: Effekt von GCDCA auf die AP-1 Aktivität im Reporterassay. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit dem Collagenase-*Firefly*-Luciferase-Plasmid und dem TK-*Renilla*-Luciferase-Plasmid transfiziert. 24h später erfolgte eine Inkubation mit 10 µM GCDCA oder 10nM PMA für 1h oder keine Stimulation. Zellyse und Messung der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase mittels Dual-Luciferase-Kit. Ratio von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferase zeigt Aktivierung von AP-1. Unstimulierte Zellen auf 1 normiert. (MW ± SD, n=8)

3.2.4.2. Überexpression der AP-1 Komponenten und deren Auswirkung auf die AP-1 Aktivität und Apoptoseinduktion

Transfektion von HepG2-Ntcp Zellen mit den Expressionsplasmiden für cFos, JunB und cJun induzierte eine verstärkte Produktion der Proteine (siehe Abbildung 61).

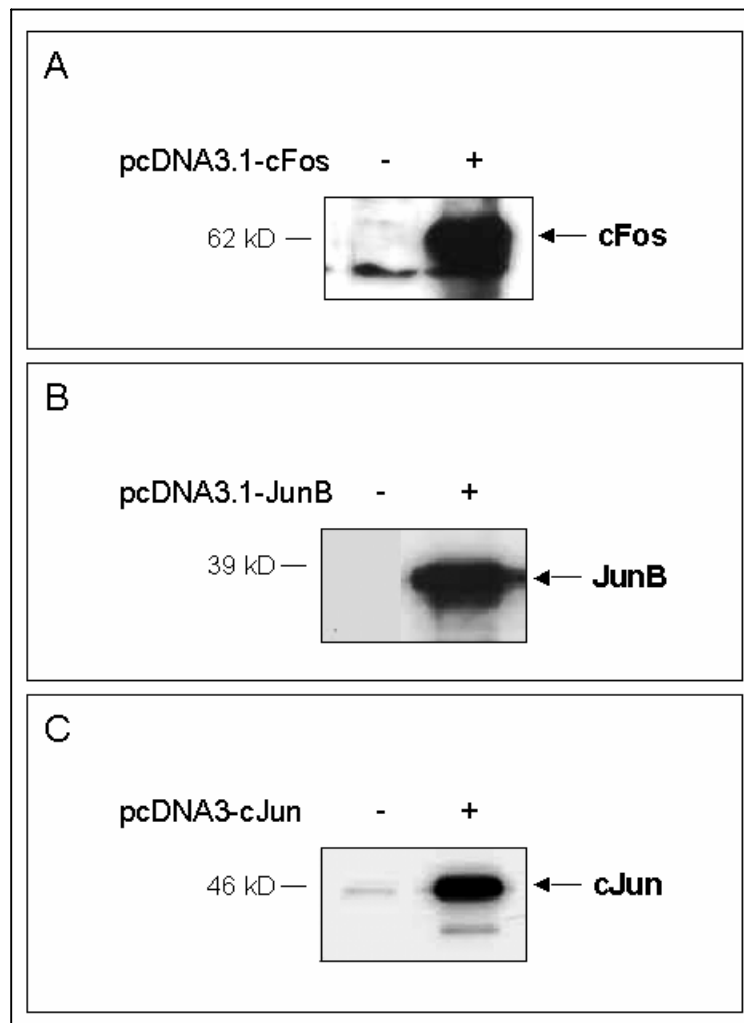


Abbildung 61: Transfektion mit cFos-, JunB- und cJun-Plasmiden induziert deren Expression. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden **(A)** cFos, **(B)** JunB und **(C)** cJun transfiziert. Western-Blots der Kernextrakte mit den spezifischen Antikörpern zeigen eine gesteigerte Expression der Proteine nach Transfektion der Plasmide.

Überexpression der cFos, JunB und cJun-Plasmide allein, in Kombination miteinander oder zusammen mit dem mutierten cJun-Gen im TAM67 Plasmid führte zu einer deutlichen Modulation der Aktivität von AP-1 im Reporterassay (siehe Abbildung 62). Die Überexpression von cFos und cJun erhöhte die AP-1 Aktivität

deutlich, wohingegen JunB und TAM67, das dominant negativ mutierte cJun Plasmid, die AP-1 Aktivität kaum beeinflussten. Die gleichzeitige Expression von cFos/JunB und cFos/cJun steigerte die AP-1 Aktivität weiter. Die Überexpressionen von cJun/JunB und cJun/TAM67 zeigten, dass sowohl JunB als auch TAM67 die cJun-induzierte AP-1 Aktivierung verhindern. Die cFos-vermittelte AP-1 Aktivierung wurde von TAM67 jedoch nicht reduziert, sondern verglichen mit ausschließlich cFos transfizierten Zellen leicht erhöht. Die Aktivität von AP-1 wurde weder durch die Überexpression von JunB allein noch in Kombination mit TAM67 verändert.

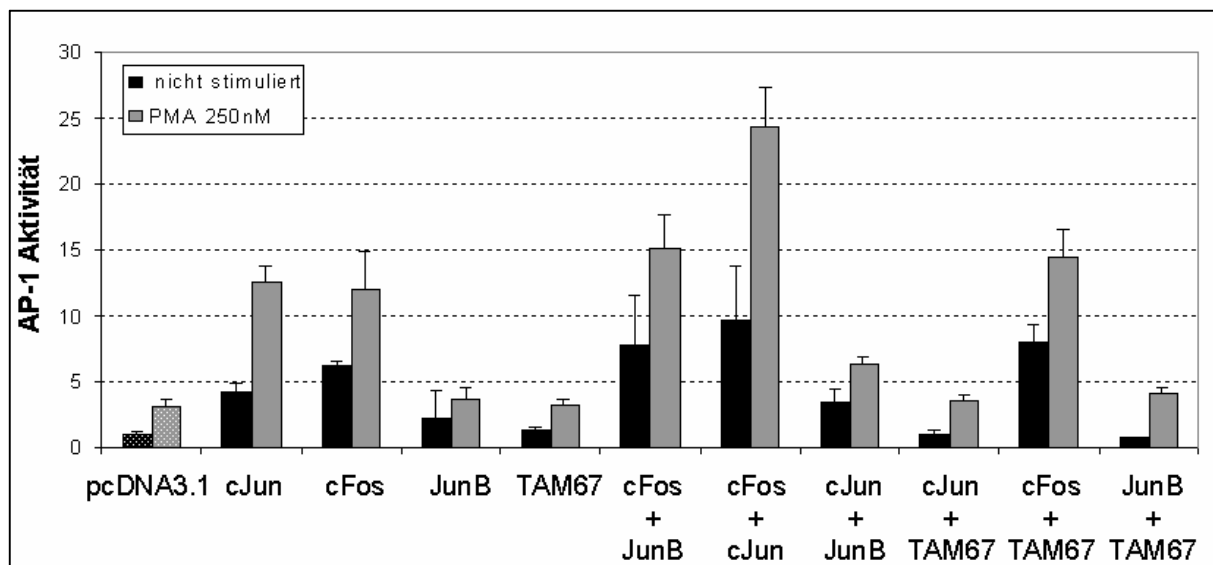


Abbildung 62: AP-1 Komponenten modulieren die AP-1 Aktivität im Reporter-Gen-Assay. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit Collagenase-Firefly-Luciferase und TK-Renilla-Luciferase-Plasmid transfiziert. Zusätzlich wurden die angegebenen Expressionsplasmide cotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 250nM PMA für 4h inkubiert oder nicht stimuliert. Zellyse und Messung der Firefly- und Renilla-Luciferase mittels Dual-Luciferase-Kit. Ratio von Firefly- zu Renilla-Luciferase zeigt Aktivierung von AP-1. Unstimulierte Zellen auf 1 normiert. (MW \pm SD, n=3)

Beeinflusst die Überexpression der verschiedenen AP-1 Komponenten die GCDCA-vermittelte Apoptoseinduktion in HepG2-Ntcp Zellen? Zur Beantwortung dieser Frage wurden HepG2-Ntcp Zellen mit den AP-1 Komponenten einzeln oder in Kombination transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden sie mit 75 μ M GCDCA für 4h inkubiert oder nicht stimuliert. Weder die AP-1 Proteine noch die cJun-Mutante TAM67 beeinflussten die Gallensäuren-vermittelte Apoptoseinduktion. Die Quantifizierung der Apoptoserate erfolgte über Messung der Caspase-3/7 Aktivität. Die mit den AP-1-Konstrukten transfizierten Zellen reagierten wie die Kontrollzellen, die mit pcDNA3.1 transfiziert wurden (siehe Abbildung 63).

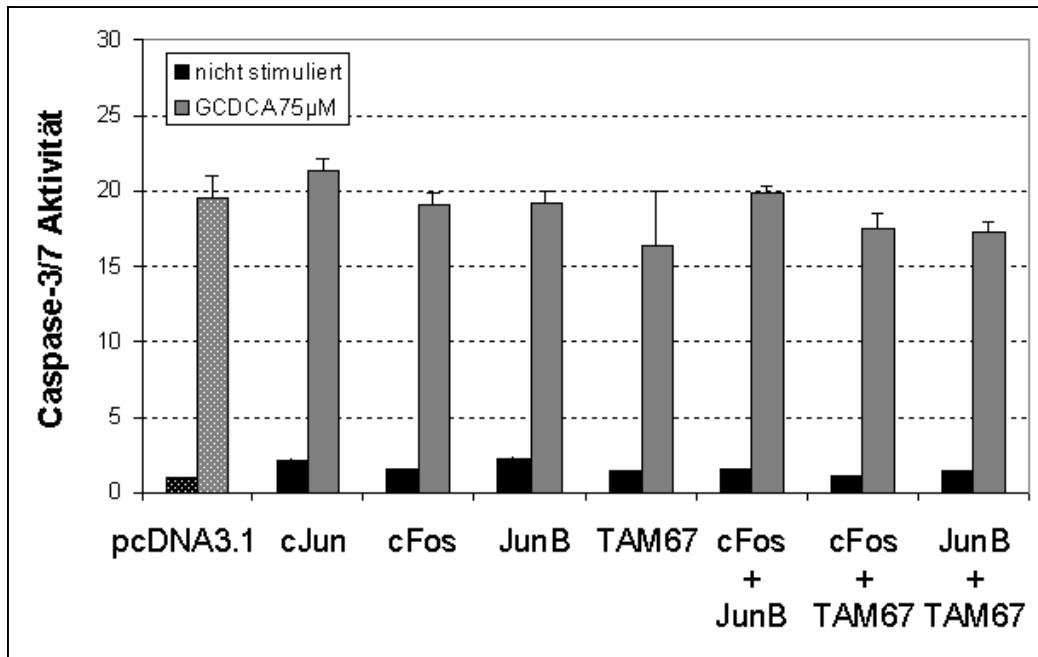


Abbildung 63: AP-1 Komponenten verändern GCDCA-induzierte Apoptoserate nicht. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden sie mit 75 µM GCDCA für 4h inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate über Caspase-3/7 Aktivitätsassay. (MW ± SD, n=3)

3.2.4.3. Inhibition von AP-1 durch Curcumin verhindert die GCDCA-vermittelte Apoptose

Curcumin, das gelbe Pigment der Gelbwurz, ist ein bekannter Inhibitor des AP-1 Transkriptionskomplexes [32, 44, 117].

Zur Überprüfung der AP-1 Inhibition durch Curcumin wurde der *electromobility shift* assay (EMSA) durchgeführt und HepG2-Ntcp Zellen mit 250nM PMA in An- und Abwesenheit von 1 µM – 50 µM Curcumin inkubiert. Analyse der Kernextrakte zeigte eine deutliche Erhöhung des AP-1 Signals durch PMA verglichen mit nicht stimulierten Zellen. Curcumin allein zeigte keine Veränderung gegenüber der negativen Kontrolle. Gleichzeitige Gabe von 250nM PMA und 50 µM Curcumin verhinderte die Ausbildung der AP-1-Oligonukleotidkomplexe. Somit hemmt Curcumin die Aktivität von AP-1 im untersuchten Zellmodell (siehe Abbildung 64).

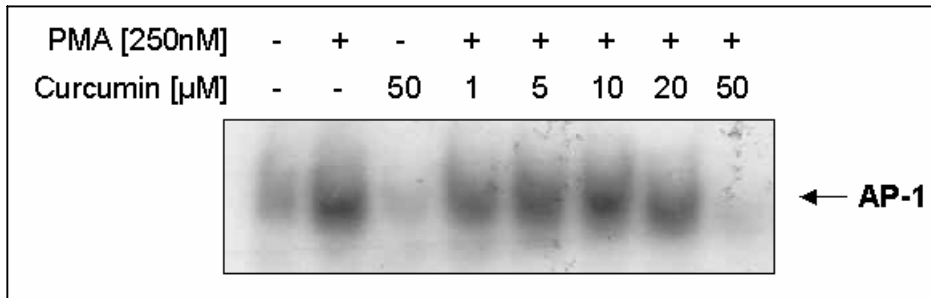


Abbildung 64: Curcumin inhibiert AP-1 im EMSA. HepG2-Ntcp Zellen wurden 1h mit 250nM PMA in Ab- oder Anwesenheit von Curcumin in den angegebenen Konzentrationen inkubiert oder nicht stimuliert. Analyse der Kernextrakte auf vorhandene AP-1-Komplexe mittels EMSA.

Ein Reporterassay, bei dem die Zellen mit PMA allein oder zusammen mit Curcumin in Konzentrationen von 5 μ M bis 50 μ M inkubiert wurden, ermöglichte die Quantifizierung der transkriptionellen AP-1 Aktivität. 250nM PMA zeigten eine starke Aktivierung der AP-1 Aktivität auf das 8,4-fache von nicht stimulierten Zellen. 50 μ M Curcumin allein erhöhte den Wert kaum. 5 μ M Curcumin hatten bei der gleichzeitigen Inkubation mit 250nM PMA keine Auswirkung auf die PMA-vermittelte Aktivierung von AP-1. Die simultane Gabe von 250 nM PMA und 10 μ M oder 20 μ M Curcumin verringerte die PMA-induzierte AP-1 Aktivierung um 19% bzw. 55% auf das 6,7- und 3,7-fache der nicht stimulierten Zellen. Bei gleichzeitiger Stimulation mit 50 μ M Curcumin und PMA erreichte die AP-1 Aktivität Kontrollniveau (siehe Abbildung 65).

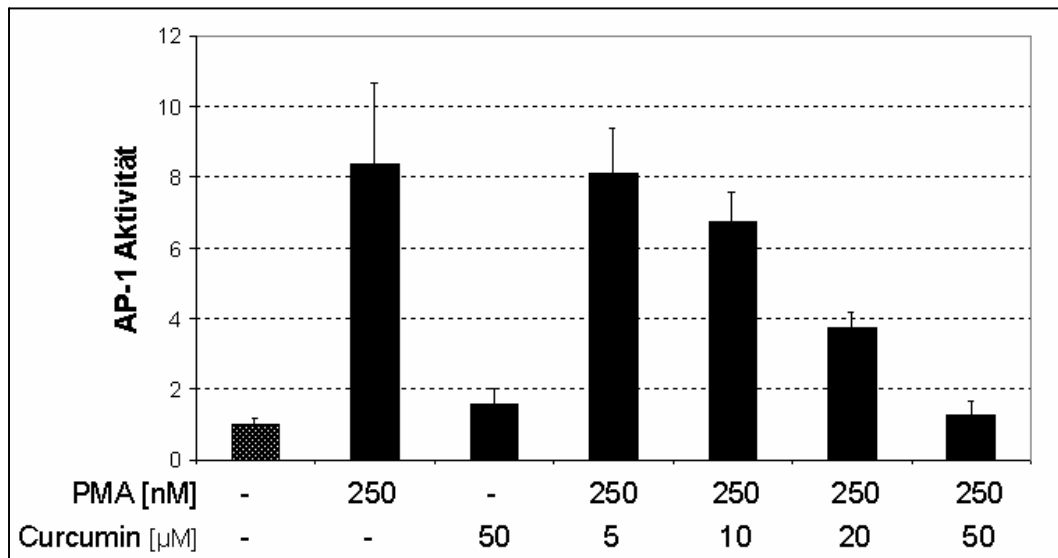


Abbildung 65: Curcumin inhibiert die Aktivität von AP-1 im Reporterassay. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit Collagenase-*Firefly*-Luciferase und TK-*Renilla*-Luciferase-Plasmiden cotransfiziert. 24h später erfolgte die Inkubation mit 250nM PMA für 4h allein oder zusammen mit der angegebenen Konzentration Curcumin (5 – 50 µM). Kontrollzellen wurden nicht stimuliert. Zellyse und Quantifizierung der Aktivitäten von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase mittels Dual-Luciferase-Kit. Ratio von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase zeigte die Aktivierung von AP-1. Unstimulierte Zellen auf 1 normiert. (MW ± SD, n=3)

Nachdem gezeigt wurde, dass Curcumin AP-1 im verwendeten Zelltyp inhibiert, wurde die Wirkung von Curcumin auf die Gallensäuren-induzierte Apoptose untersucht (siehe Abbildung 66). Inkubation der Zellen mit GCDCA (A) oder TLCA (B) in Ab- und Anwesenheit von Curcumin (1 µM – 100 µM) und Quantifizierung der Apoptoserate mittels Caspase-3/7 Assay ergab folgendes Ergebnis: beide Gallensäuren induzierten sehr effizient Apoptose, die durch Curcumin dosisabhängig gehemmt wurde. 50 µM Curcumin allein induzierte keine Apoptose. 1 µM Curcumin hatte keinen Einfluss auf die Gallensäuren-induzierte Apoptose; 10 µM, 20 µM und 50 µM Curcumin reduzierten die GCDCA-vermittelte Apoptoseinduktion um 52%, 72% und 95%. 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM und 100 µM Curcumin reduzierten die TLCA-induzierte Apoptoserate um 55%, 75%, 85%, 90% und 98% signifikant.

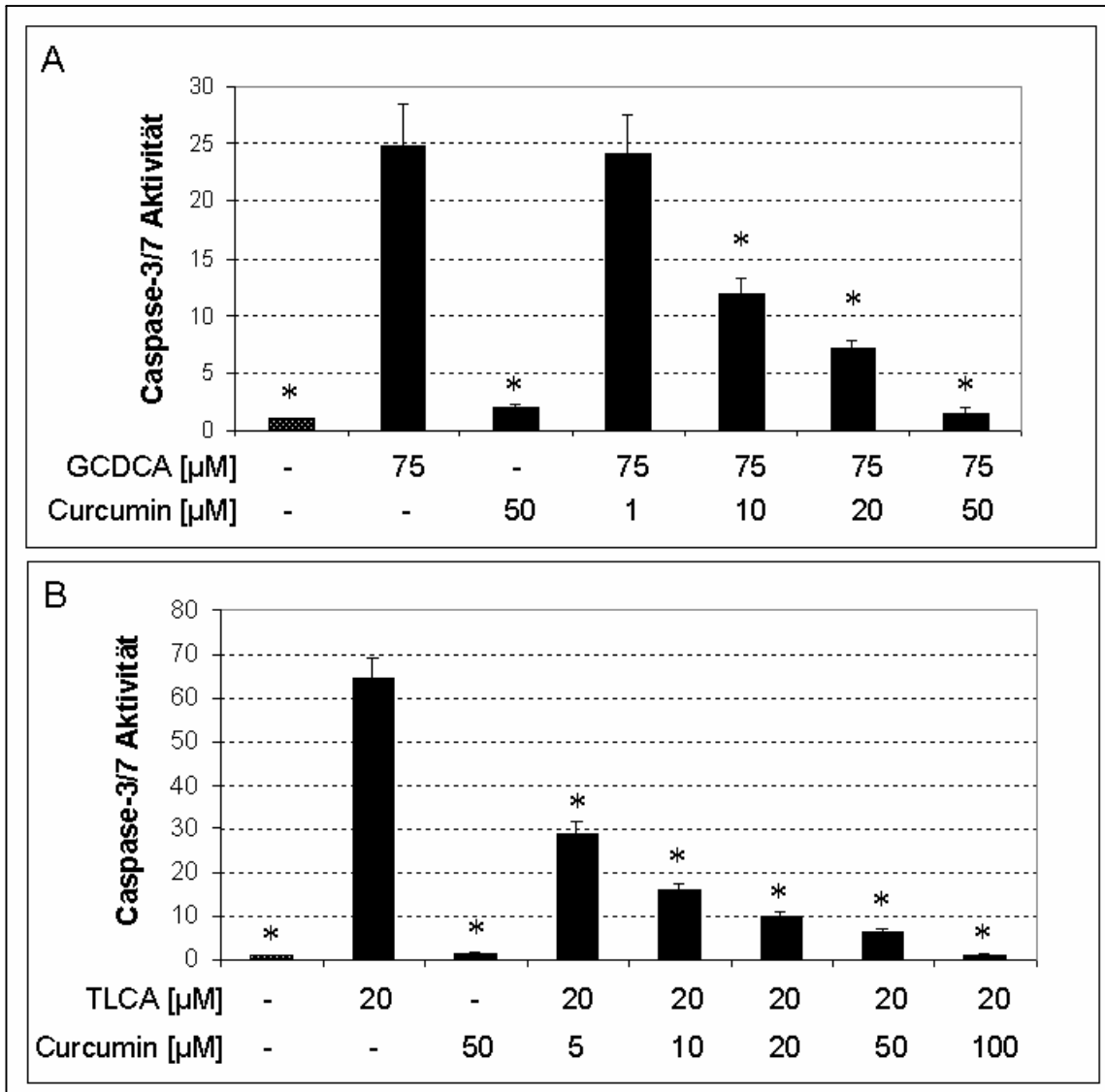


Abbildung 66: Curcumin inhibiert die GCDCA- und TLCA-vermittelte Apoptose. (A) HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h nicht stimuliert, mit 50 μM Curcumin oder mit GCDCA in Ab- und Anwesenheit von Curcumin in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM , 20 μM oder 50 μM inkubiert. **(B)** HepG2-Ntcp Zellen wurden 4h mit 20 μM TLCA allein, 20 μM TLCA mit den angegebenen Konzentrationen Curcumin oder mit 50 μM Curcumin allein inkubiert. Kontrollzellen wurden nicht stimuliert. **(A+B)** Quantifizierung der Apoptoserate mittels Messung der Caspase-3/7 Aktivität. Nicht stimulierte Zellen auf 1 normiert. (MW \pm SD, n=3, * $p < 0,05$ vgl. GCDCA bzw. TLCA)

Um ausschließen zu können, dass die Reduzierung der Apoptoserate durch Curcumin nach GCDCA-Stimulation auf eine verringerte Gallensäureaufnahme zurückzuführen ist, wurde die Aufnahme der radioaktiv markierten Gallensäure [^3H]-Taurocholsäure (TCA) in An- und Abwesenheit von Curcumin in HepG2-Ntcp Zellen untersucht. Curcumin in den Konzentrationen 20 μM und 50 μM reduzierte die Gallensäureaufnahme nicht wesentlich (siehe Abbildung 67).

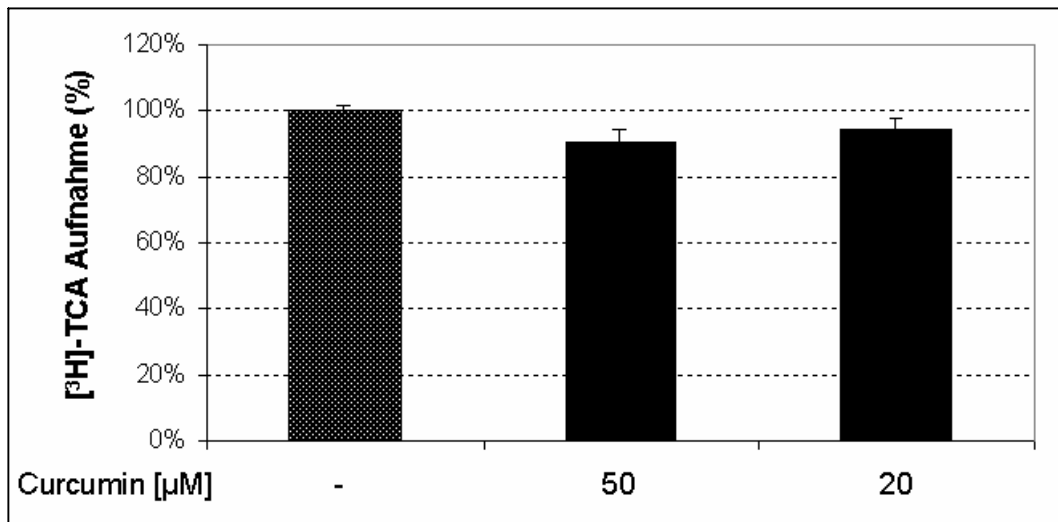


Abbildung 67: Curcumin beeinflusst die Gallensäureaufnahme nicht. HepG2-Ntcp Zellen wurden 20 Min mit der radioaktiv markierten Gallensäure [^3H]-TCA in An- und Abwesenheit von der angegebenen Menge Curcumin inkubiert. Anschließend wurde die [^3H]-TCA-Aufnahme der Zellen ermittelt und auf den Gesamtproteingehalt bezogen. Die Aufnahmekapazität ohne Curcumininkubation wurde auf 100% normiert. (MW \pm SD, n = 3)

Somit hat Curcumin in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Aufnahme der Gallensäuren in Hepatozyten.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die molekularen Mechanismen der Apoptoseinduktion und die transkriptionelle Modulation durch die quantitativ bedeutendste hydrophobe Gallensäure des Menschen Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) in der humanen Hepatomzelllinie HepG2. GCDCA induziert in Konzentrationen bis 200 μM *in vitro* Apoptose. Höhere Konzentrationen dagegen beeinträchtigen die Zellmembranen durch die auftretende Detergenzwirkung und lösen einen nekrotischen Zelluntergang aus [183]. Die erhöhten Konzentrationen toxischer, hydrophober Gallensäuren werden für die Leberzellschädigung während der Cholestase verantwortlich gemacht. Die Konzentrationen der hydrophoben Gallensäuren korrelieren mit dem Grad der Leberschädigung während der Cholestase [181].

Der molekulare Mechanismus der Apoptoseinduktion wird kontrovers diskutiert und ist Gegenstand dieser Arbeit. Die Ergebnisse zeigen, dass GCDCA in humanen Zelllinien sowohl Fas-Rezeptor als auch Caspase-8 unabhängig effizient Apoptose auslösen kann. Deshalb wird eine GCDCA-vermittelte mitochondriale Apoptoseinduktion postuliert. Ein weiterer Aspekt, der für das Verständnis der GCDCA-vermittelten Apoptose wichtig ist und Hinweise auf neue Therapieansätze geben kann, ist die Modulation der Transkription. Der Einfluss der hydrophoben Gallensäure GCDCA auf die Transkription von pro- und antiapoptotischen Genen in HepG2-Ntcp Zellen ist bisher unzureichend bekannt und wurde ebenfalls untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 eine wichtige Rolle bei der GCDCA-vermittelten Apoptose spielen. Aktivierung von NF- κ B durch Sulfasalazin bzw. Inhibierung von AP-1 mittels Curcumin verhindert die Gallensäuren-vermittelte Apoptose. Deshalb scheint die Transkription bestimmter NF- κ B- und AP-1-abhängiger Gene essentiell für die Gallensäuren-vermittelte Apoptoseinduktion zu sein.

4.1. Molekularer Mechanismus der Gallensäuren- vermittelten Apoptoseinduktion

Hydrophobe Gallensäuren zeigen ab einer Konzentration von 200 – 300 μM Zellmembranschädigungen aufgrund Ihrer Detergenzwirkung [183]. In weitaus geringeren Konzentrationen lösen sie den programmierten Zelltod aus, nachdem sie in die Zellen aufgenommen worden sind. Die humane Hepatomzelllinie HepG2 ist resistent gegenüber GCDCA- oder TLCA-induzierter Apoptose. Nur HepG2-Zellen, die stabil mit dem Hepatozyten-spezifischen Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert sind, induzieren nach Inkubation mit GCDCA oder TLCA sehr effizient Apoptose (Abbildung 10 und Abbildung 11). Die Gallensäuren aktivieren folglich nach Aufnahme molekulare Mechanismen innerhalb der Zelle, die zum Zelltod führen. Die Apoptoseinduktion ist Caspase-abhängig, da gleichzeitige Zugabe des Pancaspaseninhibitors Z-VAD-FMK die zytotoxische Wirkung der Gallensäuren aufhebt. Nach Gallensäurenstimulation können aktivierte Formen sowohl der Initiatorcaspasen, Caspase-8 und Caspase-9, als auch der Effektorcaspasen, Caspase-3 und -7, nachgewiesen werden (Abbildung 12).

Umstritten ist, ob Gallensäuren Apoptose über die Todesrezeptoren, vor allem über Fas, auslösen oder die Induktion davon unabhängig ist. Aktuelle Konzepte favorisieren die Todesrezeptor-vermittelte gegenüber der Mitochondrien-vermittelten Induktion, wobei dabei beachtet werden sollte, dass die Versuche zumeist an Nagetieren bzw. primären Hepatozyten oder Hepatomzelllinien aus diesen Tieren durchgeführt wurden. Abbildung 68 gibt einen Überblick der molekularen Induktionsmechanismen der Gallensäuren-vermittelten Apoptose in Hepatozyten. Unbekannt ist, ob Caspase-8 durch Caspase-9 aktiviert werden kann bzw. ob ein Protein diese Reaktion vermittelt (??? in Abbildung 68). Caspase-6 wurde als möglicher Mediator diskutiert [219].

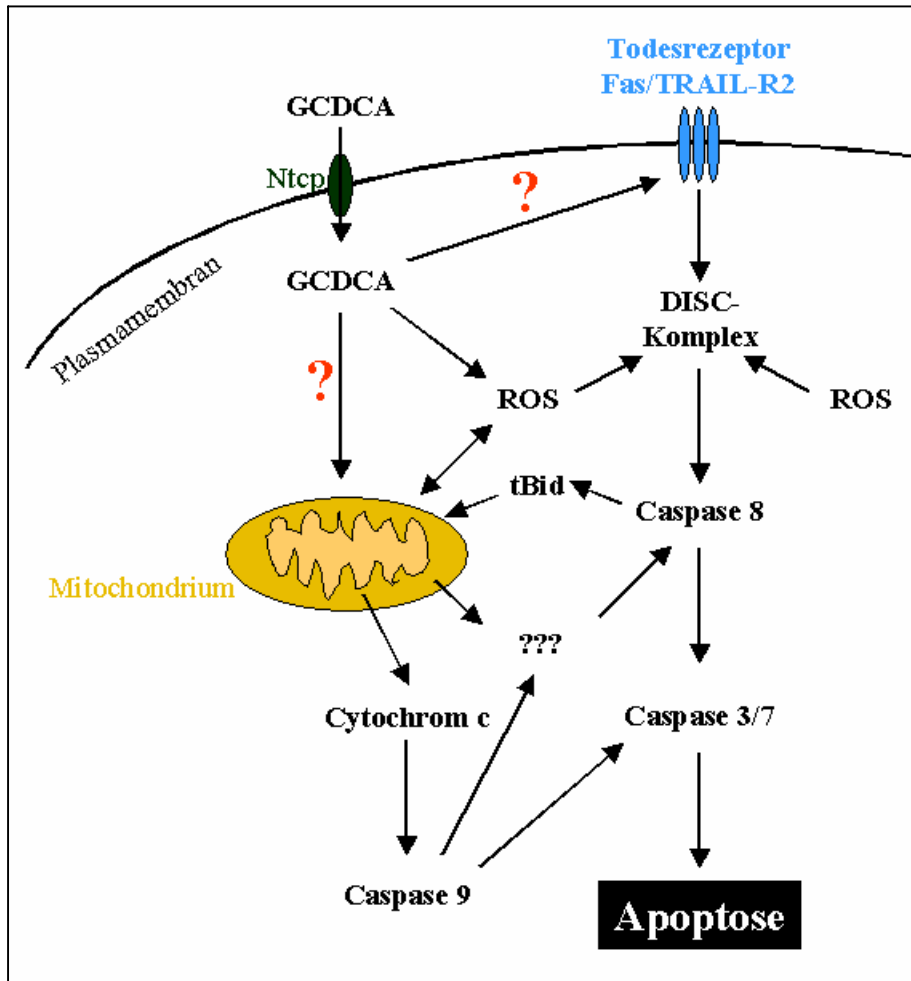


Abbildung 68: Zusammenfassung der molekularen Mechanismen der Gallensäure-vermittelten Apoptose.

4.1.1. Bedeutung des Fas-Rezeptors

GCDCA induziert in Hepatozyten aus Nagetieren die Oligomerisierung und Aktivierung mehrerer Fas-Rezeptor-Moleküle unabhängig von Fas-Ligand [52]. Nach Aktivierung von Fas lagern sich die Adaptermoleküle FADD und Procaspase-8 an die cytosolische Domäne von Fas an. Der DISC-Komplex bildet sich aus. Caspase-8 wird aktiviert und proteolysiert weitere Caspasen sowie das proapoptotische Bcl-2 Protein Bid [205]. Da Hepatozyten Typ-II Zellen sind, wird das apoptotische Signal über die Mitochondrien verstärkt. tBid (*truncated*) transloziert zu den Mitochondrien und interagiert mit weiteren Bcl-2 Proteinen. Proapoptotische Faktoren treten aus dem Intermembranraum der Mitochondrien aus; das Apoptosom mit aktiver Caspase-9 wird ausgebildet. Die Effektorcaspasen-3 und -7 werden aktiviert, was den Zelltod herbeiführt [49].

Hydrophobe Gallensäuren scheinen in primären Rattenhepatozyten und McNtcp.24 Zellen den aktiven Transport von Fas an die Plasmamembran zu induzieren. Die erhöhte Konzentration von Fas erleichtert die Oligomerisierung und Aktivierung des Rezeptors. Häussinger et al. zeigten in 24h kultivierten Rattenhepatozyten, dass TLCS (Taurolithocholat-3-Sulphat) den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) aktiviert, der daraufhin mit dem Fas-Rezeptor assoziiert und diesen an Tyrosin phosphoryliert. Die Phosphorylierung aktiviert Fas und induziert den Transport und Einbau von Fas in die Plasmamembran. Daraufhin bildet sich der DISC-Komplex aus. Die Apoptosekaskade wird ausgelöst [66, 165]. Die Arbeitsgruppe von Gores untersuchte McNtcp.24 Zellen, eine Hepatomzelllinie aus *Rattus rattus*, die stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert wurde. Diese Zellen zeigten nach GCDCA Stimulation eine 6-fache Erhöhung der Fas-Proteine in der Plasmamembran. GCDCA induzierte einen Golgi- und Mikrotubuli-abhängigen Transport von cytoplasmatischen Fas-Proteinen an die Plasmamembran [191].

Versuche mit gallengangsligierten Wildtyp oder Fas- bzw. Fas-Ligand-Knockout Mäusen zeigten ebenfalls Fas-abhängige und Fas-Ligand-unabhängige Apoptose. Gallengangsligierte Fas-defiziente Mäuse hatten eine verringerte Apoptoserate verglichen mit gallengangsligierten Wildtyp Mäusen. Fas-Ligand Knockout Mäuse dagegen verhielten sich in identischen Versuchen wie der Wildtyp [137].

Wenn in Hepatozyten aus Wildtyp oder Fas-defizienten Mäusen die Expression von Bid durch antisense-Oligonukleotide blockiert wird, ist die GCDCA-induzierte Apoptose signifikant verringert. Dies verdeutlicht, wie wichtig die Kommunikation des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs ist. Da die Inhibierung der Bid-Expression durch antisense-Oligonukleotide auch die Leberschädigung bei gallengangsligierten Mäusen verringert, könnte Bid ein wichtiges Substrat für neuartige Therapieansätze sein [80].

Eine alternative Hypothese der Todesrezeptor-vermittelten Apoptoseinduktion postulieren Gores et. al durch Versuche mit Fas-defizienten humanen Huh7-Zellen. Es wurde gezeigt, dass Huh-7 Zellen nach Aufnahme der Gallensäure GCDCA in Apoptose gehen können. Da die Stimulation mit GCDCA sowohl die Transkription als auch die Expression von TRAIL-R2/DR5 auf das 10-fache steigerte und zusätzlich eine Aggregation von TRAIL-R2/DR5-Molekülen zu beobachten war, wurde postuliert, dass GCDCA über den Todesrezeptor TRAIL unabhängig von Fas

Apoptose induzieren kann [79]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass GCDCA zusätzlich in Huh7-Ntcp Zellen die Phosphorylierung von cFLIP stimuliert, was die Bindung an FADD reduziert. Dadurch wird die Ausbildung des DISC-Komplexes mit Aktivierung der Caspase-8 erleichtert [81].

Den Todesrezeptor-vermittelten Konzepten widersprechen Versuche an isolierten Mitochondrien. Sie beweisen die Fähigkeit der hydrophoben Gallensäuren, direkt mit der Mitochondrienmembran zu interagieren und diese zu verändern. GCDCA und DCA modifizieren die Proteinanordnung, den Redox-Status, die Lipidpolarität und –fluidität der Mitochondrienmembran. Hydrophobe Gallensäuren induzieren den Austritt von proapoptotischem Cytochrom c [194], [103]. Cytochrom c ist ein wichtiger Cofaktor in der Elektronentransportkette. Ohne ihn ist der Elektronenfluss unterbrochen, so dass reaktive Sauerstoffintermediate entstehen. Rodrigues et al. zeigten ebenfalls an isolierten Mitochondrien aus Ratten, dass Deoxycholat (DCA) vor allem die Permeabilität der inneren Membran erhöht, außerdem das Membranpotential herabsetzt und die oxidative Phosphorylierung entkoppelt. Als Folge dessen schwellen die Mitochondrien an und Cytochrom c tritt aus [167, 168]. Ein weiteres Konzept der Rezeptor-unabhängigen Apoptose besagt, dass die Gallensäuren nach der Aufnahme oxidativen Stress mit Generierung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROS, *reactive oxygen species*) induzieren und dass diese die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran auslösen [192, 193, 229]. Inkubation der Kolonkarzinomzelllinien HT-29, Caco-2, SW480 und SW620 mit Deoxycholsäure induziert in allen vier Zelllinien Apoptose. Genauere Untersuchungen durch Schlottmann et al. zeigten, dass aber nur zwei der vier Zelllinien Fas exprimieren. Deoxycholsäure verändert das mitochondriale Transmembranpotential in allen Zelllinien, sowohl in intakten Zellen als auch in isolierten Mitochondrien [220].

Zur Klärung der Frage, ob humane Hepatomzelllinien Gallensäuren-vermittelte Apoptose über den Fas-Rezeptor induzieren, wurden die Fas-defizienten Zellen Hep3B und Huh7 mit dem Gallensäuretransporter Ntcp stabil transfiziert. Von Hep3B-Zellen ist bekannt, dass sie Mutationen im p53- und Fas-Rezeptor-Gen aufweisen, die restlichen Komponenten des DISC-Komplexes aber unverändert sind. Nach stabiler Transfektion der Hep3B-Zellen mit dem murinen Fas-Rezeptor

reagieren sie auf Stimulation mit dem Fas-Liganden oder den antagonistischen Antikörpern APO-1 bzw. Jo-2 mit Apoptoseinduktion [111]. Hep3B Zellen sind folglich in der Lage, den DISC-Komplex nach Aktivierung eines Todesrezeptors auszubilden; sie sind nur Fas-defizient. Stimulation der Hep3B und Huh7 Zellen mit Gallensäuren zeigt, wie auch bei HepG2-Zellen, keine Apoptoseinduktion, da sie keinen Gallensäuretransporter besitzen. Hydrophobe Gallensäuren induzieren in Hepatozyten nur nach Aufnahme in die Zellen Apoptose. Inkubationen der stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfizierten Hep3B-Ntcp oder Huh7-Ntcp Zellen mit hydrophoben Gallensäuren zeigen deutlich, dass sie sehr effizient, auch ohne Beteiligung des Fas-Rezeptors, Apoptose auslösen können, nachdem sie die Gallensäuren aufgenommen haben (Abbildung 17 und Abbildung 18). Folglich lösen Gallensäuren Apoptose in humanen Zellen nicht, oder nicht ausschließlich, über den Fas-Rezeptor aus. Da Hepatozyten viele andere Todesrezeptoren, wie TNF-R1 (*tumor necrosis factor receptor*), TRAIL-R1/DR4 (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1*) und TRAIL-R2/DR5, exprimieren, könnten Gallensäuren auch diese aktivieren und die Ausbildung des DISC-Komplexes herbeiführen (siehe Abbildung 69). Gores et al. konnte nach Inkubation von Huh7-Ntcp Zellen mit 200 μ M GCDCA über einen Zeitraum von 12h ebenfalls eine Apoptoseinduktion beobachten. Da zudem die mRNA und das Protein des TRAIL-R2 anstiegen und eine vermehrte Aggregation von TRAIL-R2-Molekülen detektiert werden konnte, wurde eine GCDCA-vermittelte Aktivierung dieses Todesrezeptors postuliert [79]. Bei diesen Versuchen sollte allerdings beachtet werden, dass sehr hohe GCDCA-Konzentrationen von 200 μ M eingesetzt wurden und über einen sehr langen Zeitraum von 12h stimuliert worden ist. Huh7-Ntcp Zellen in der vorliegenden Arbeit reagierten bereits nach 4h Inkubation mit 75 μ M GCDCA mit einer 14-fachen Steigerung der Apoptoserate verglichen mit nicht stimulierten Huh7-Ntcp Zellen. Dies bestätigt, dass humane Hepatomzelllinien Gallensäuren-vermittelte Apoptose unabhängig vom Fas-Rezeptor induzieren können.

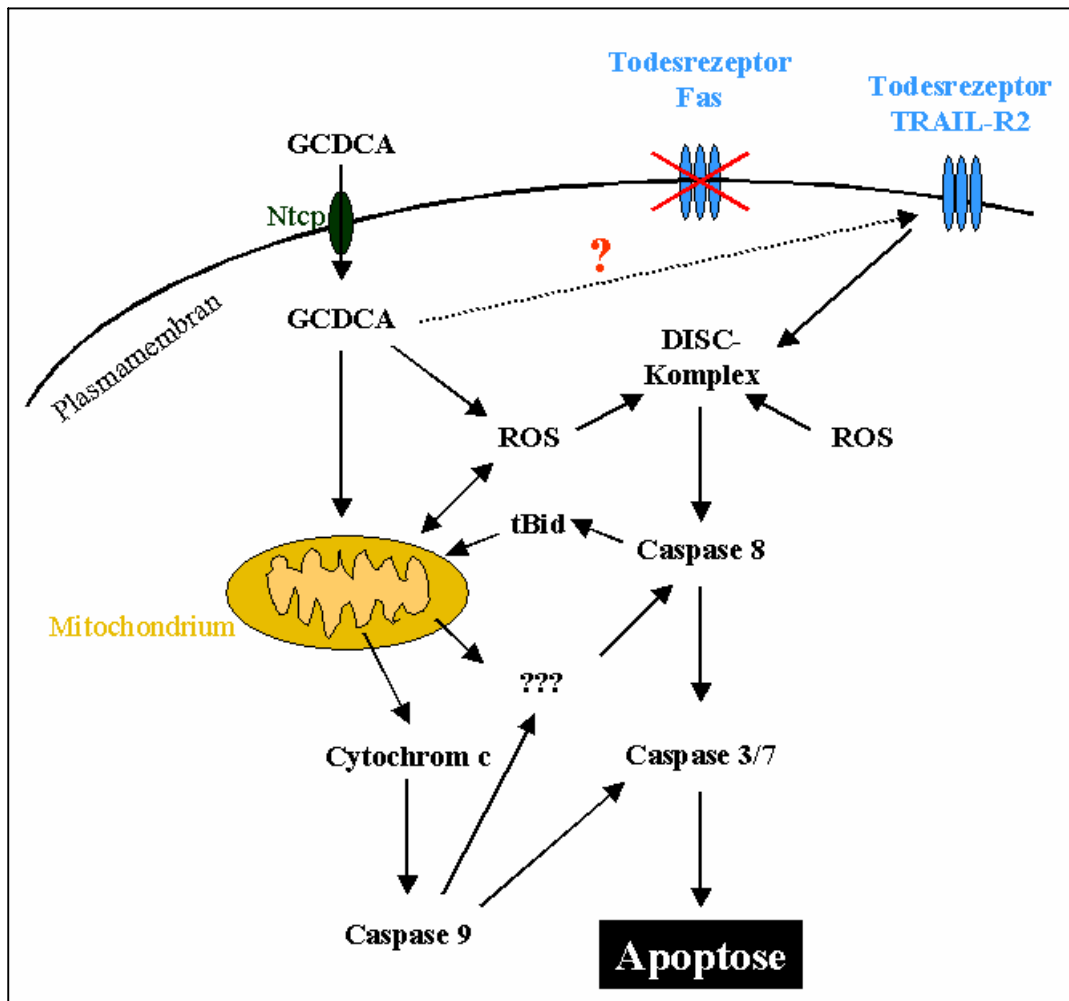


Abbildung 69: Gallensäuren lösen unabhängig von Fas-Rezeptor Apoptose aus.

4.1.2. Bedeutung anderer Todesrezeptoren und der Caspase-8

Als nächstes interessierte die Frage, ob andere Todesrezeptoren für die GCDCA-induzierte Apoptose notwendig sind. Alle Todesrezeptoren induzieren nach deren Aktivierung letztendlich die Ausbildung des DISC-Komplexes mit Anlagerung von mehreren FADD- und Caspase-8-Molekülen. Die hohe lokale Konzentration der Caspase-8 führt zur Aktivierung und Proteolyse dieser Caspase, die dann weitere Caspasen aktiviert und den apoptotischen Zelluntergang auslöst. Um die Todesrezeptor-vermittelte Apoptoseinduktion generell zu inhibieren, muss folglich die Ausbildung des DISC-Komplexes mit Aktivierung der Initiatorcaspase-8 ausgeschaltet werden. Die Anwendung der sehr effizienten und zuverlässigen Methode der siRNA eignet sich für die Inhibierung der Expression eines spezifischen Gens sehr gut. Deshalb wurde diese Technik zur spezifischen Herabregulation der

Caspase-8 verwendet. Vorversuche zeigten eine eindeutige Reduktion des Caspase-8 Proteingehalts ohne Beeinflussung anderer Proteine (Abbildung 24 und Abbildung 25). Wenn ein Stimulus in Caspase-8 defizienten HepG2-Ntcp Zellen Apoptose auslösen kann, aktiviert er folglich die Apoptosekaskade über den mitochondrialen Signalweg. Als positive Kontrolle wurde ein Stimulus verwendet, der Apoptose ausschließlich über Todesrezeptoren auslöst: TNF- α . Da TNF- α aber gleichzeitig Überlebenssignale aktiviert, wurden diese durch die simultane Inkubation mit Actinomycin D inhibiert. TNF- α bindet an den Todesrezeptor TNF- α -R1 und aktiviert diesen. Da die Überlebenssignalwege durch Actinomycin D gehemmt wurden, induziert der aktivierte TNF- α -R1 ausschließlich Apoptose über die Ausbildung des DISC-Komplexes und die Aktivierung der Caspase-8. Caspase-8 schneidet daraufhin sowohl Caspase-3 und -7 als auch Bid, das den mitochondrialen Weg der Apoptose aktiviert. Wie die siRNA Experimente verdeutlichen, reagieren nicht transfizierte und mit Kontroll-siRNA gegen GFP transfizierte Zellen auf die Inkubation mit TNF- α und Actinomycin D mit einer deutlichen, 15,5-fachen Steigerung der Apoptoserate verglichen mit nicht stimulierten Zellen sowie einer Aktivierung der Caspasen-8, -9, -3 und -7. Ist die Konzentration des Caspase-8 Proteins allerdings durch siRNA stark reduziert, induzieren TNF- α und Actinomycin D nur noch sehr wenig Apoptose: Die Apoptoserate geht um 79% auf das 3-fache der nicht stimulierten Zellen zurück. Die Analyse der Caspasen zeigt ebenso deutlich, dass sämtliche Caspasen kaum mehr aktiviert werden können. Ein völlig anderes Ergebnis liefert die Inkubation mit der hydrophoben Gallensäure GCDCA. Nicht transfizierte und Kontrolltransfizierte (siRNA GFP) Zellen induzieren nach GCDCA-Inkubation Apoptose und aktivieren die Caspasen-8, -9, -3 und -7. Caspase-8 defiziente Zellen sind aber immer noch fähig nach GCDCA-Stimulation effizient Apoptose auszulösen. Die Quantifizierung der Apoptoserate zeigt nur eine Reduzierung um 26%, von der 16-fachen auf die 12-fache Erhöhung des Wertes der unstimulierten Zellen (Abbildung 27). Die Western-Blots der proteolysierten Caspasen beweisen, dass kaum aktive Caspase-8 in den mit siRNA gegen Caspase-8 transfizierten Zellen vorhanden ist. Die Aktivierung der Caspasen-9, -3 und -7 allerdings sind von einer Reduktion des Caspase-8 Proteins unbeeinflusst (Abbildung 26). Dies impliziert, dass diese unabhängig von Caspase-8, also auch unabhängig von den Todesrezeptoren, durch die GCDCA-Stimulation aktiviert werden. Ausschalten der Caspase-8 mittels siRNA verhindert die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose sehr effizient, wenn auch eine geringe

Restaktivierung zu sehen ist. Eine komplette Inhibierung ist durch die siRNA-Methode nicht möglich, da die Reduktion des Proteingehaltes nie vollständig sein wird. Dennoch wird verdeutlicht, dass die Todesrezeptor-vermittelte Induktion mittels TNF- α stark gehemmt wird; die GCDCA-vermittelte dagegen kaum. Folglich scheint GCDCA hauptsächlich über den intrinsischen Signalweg Apoptose in humanen Hepatozyten auszulösen.

Zur Bestätigung der siRNA Experimente wurde die Caspase-8 durch den spezifischen Inhibitor Z-IETD-FMK gehemmt. Dieses Molekül ist durch die Benzyloxycarbonyl-Gruppe gut zellpermeabel und bindet über die Aminosäuren Isoleucin, Glutaminsäure, Threonin und Asparaginsäure direkt ins katalytische Zentrum der Caspase-8, welches daraufhin verändert und dadurch inaktiviert wird. Versuche an HepG2-Ntcp Zellen zeigen, dass die optimale Konzentration des Inhibitors 20 μ M beträgt. Niedrigere Konzentrationen (1-10 μ M) können Caspase-8 nicht ausreichend hemmen (Abbildung 29). Konzentrationen über 20 μ M hingegen hemmen auch unspezifisch andere Caspasen, wie die Caspase-3 (Abbildung 28). Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit 75 μ M GCDCA unter der gleichzeitigen Gabe von Z-IETD-FMK (20 μ M) zeigen ein ähnliches Ergebnis wie die siRNA Versuche: Auch ohne aktive Caspase-8 werden die Caspasen-9, -3 und -7 proteolysiert. Äußerst interessant ist dabei das Verschwinden der unteren (17 kD) der beiden Banden im Western-Blot gegen aktivierte Caspase-3 nach Inhibierung der Caspase-8. Bisherige Veröffentlichungen zur Aktivierung der Caspase-3 postulieren, dass das kleinere Fragment (17kD) nur durch Autoproteolyse der großen Untereinheit entsteht, die vor allem nach Spaltung der Caspase-3 durch Caspase-8 oder -10 induziert wird [60, 197, 207]. Die obere 19 kD Bande repräsentiert die proteolysierte große Untereinheit der Caspase-3 ohne Autoproteolyse. Da die 17 kD-Bande der Caspase-3 nach Inhibierung der Caspase-8 verschwindet, wird zum einen indirekt gezeigt, dass keine Caspase-8 mehr aktiv ist, da diese Bande durch Autoproteolyse nach Aktivierung durch Caspase-8 und -10 entsteht. Zum anderen wird die Hypothese zusätzlich unterstützt, dass normalerweise Caspase-3 durch Caspase-8 in Hepatozyten nach GCDCA-Stimulation aktiviert wird, sie aber auch durch andere Caspasen, unabhängig von Caspase-8, proteolysiert werden kann.

Die Arbeitsgruppe von Gores veröffentlichte diesen Ergebnissen widersprechende Daten. Huh-7-Ntcp Zellen zeigten nach 4h Inkubation von 200 μ M GCDCA und 50

μM IETD-CHO keinen Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Eine 12h Inkubation der Zellen reduzierte die Apoptoserate von 23% bei 200 μM GCDCA auf 9% bei gleichzeitiger Applikation von 50 μM IETD-CHO [79]. Der Inhibitor IETD-CHO besitzt anstelle der Fluoromethylketon-(FMK) eine Aldehyd-Gruppe (CHO). Dadurch dissoziiert er nach Inhibierung des katalytischen Zentrums der Caspase-8 wieder ab, ohne es dabei zu inaktivieren. Folglich ist IETD-CHO nur ein reversibler Inhibitor. Eine spezifische Hemmung der Caspase-8 ohne Beeinflussung der anderen Caspasen wurde nicht gezeigt. Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit GCDCA und 50 μM IETD-FMK in der vorliegenden Arbeit zeigten eine unspezifische Hemmung der Caspase-3 (Abbildung 28). Somit könnte der von Gores et al. beobachtete Effekt unspezifisch sein. Außerdem ist zu beachten, dass Gores über einen sehr langen Zeitraum mit einer hohen Konzentration GCDCA stimulierte. Die verwendeten Huh-7-Ntcp Zellen transportierten die Gallensäuren wahrscheinlich nicht sehr effizient, da sonst eine weitaus höhere Apoptoserate hätte erreicht werden müssen. Die Bedeutung der Ergebnisse der Caspase-8-Inhibitionsversuche sind in Abbildung 70 zusammengefasst.

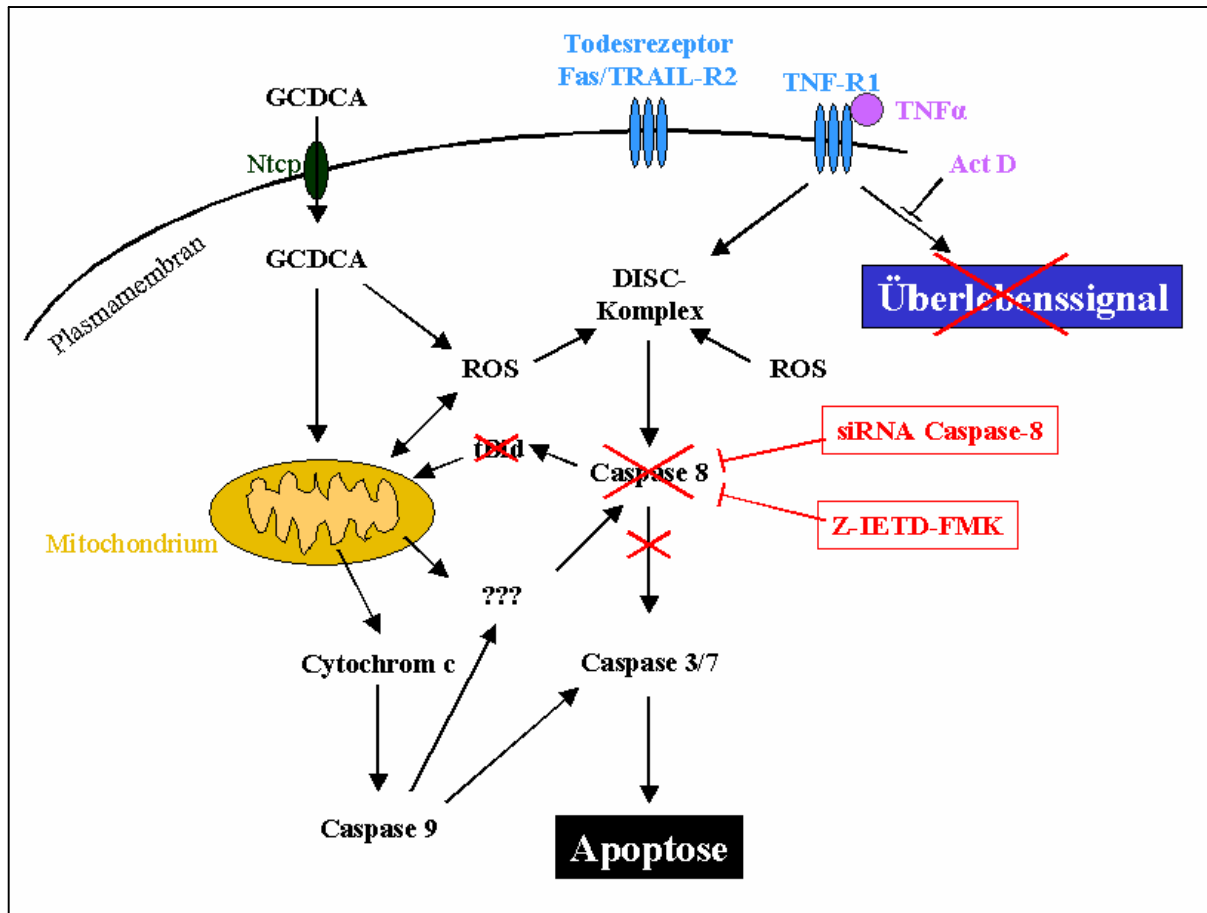


Abbildung 70: GCDCA induziert Apoptose unabhängig von Caspase-8 in HepG2-Ntcp Zellen.

4.1.3. Bedeutung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Fas-defizienten-Hepatomazelllinien Huh7-Ntcp und Hep3B-Ntcp und der Caspase-8 Inhibitionsversuche mittels siRNA und Z-IETD-FMK lassen folgendes Modell der GCDCA-vermittelten Apoptoseinduktion in humanen Hepatomazelllinien annehmen (siehe Abbildung 71):

Die Induktion kann Todesrezeptor-unabhängig erfolgen. Sowohl das Ausschalten des Fas-Rezeptors als auch der Caspase-8, verhindern nicht die GCDCA-vermittelte Apoptoseinduktion. Auch ohne Aktivierung der Caspase-8 können die Caspasen-9, -3 und -7 proteolysiert werden. Da aber nach GCDCA-Stimulation normalerweise Caspase-8 aktiviert wird, werden entweder die extrinsischen Signalwege über Todesrezeptoren zusätzlich induziert, oder die Caspase-8 wird zur Amplifizierung des Signals durch ein bisher noch nicht eindeutig identifiziertes Protein über den intrinsischen Signalweg aktiviert. Caspase-6 wurde als möglicher Induktor für diese Aktivierung diskutiert [219]. Versuche von Schoemaker et al., die primäre

Rattenhepatozyten mit einem adenoviralen dominant-negativen FADD Expressionsplasmid transfiziert haben, bestätigen das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Modell. Sie unterstützen außerdem die zweite Hypothese der nachträglichen Caspase-8 Aktivierung. Die Aktivität von Caspase-8 und -3 hat sich nach Stimulation mit GCDCA durch dominant-negatives FADD im Vergleich zu Hepatozyten, die mit dem Kontrollplasmid LacZ transfiziert wurden, nicht verändert [182]. Dies zeigt, dass GCDCA auch FADD-unabhängig Apoptose induzieren kann.

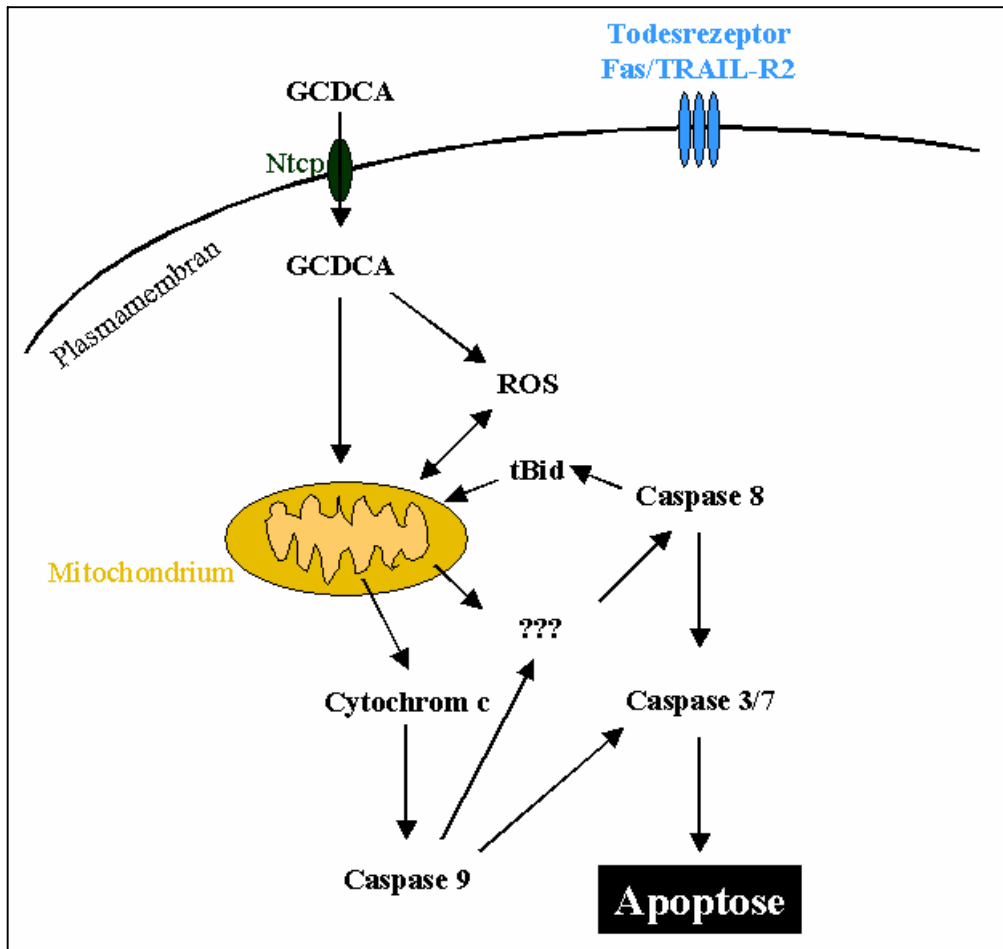


Abbildung 71: Modell der GCDCA-vermittelten Apoptoseinduktion.

4.2. Modulation der Transkription

Apoptotische Stimuli lösen nicht nur den Zelltod aus, sondern modulieren auch die Transkription apoptotischer und antiapoptotischer Gene. Zellen können sich so an den Stimulus adaptieren und die Apoptoseinduktion verstärken oder inhibieren. Von Gallensäuren ist bereits bekannt, dass sie die Transkription in Hepatozyten beeinflussen. Sie modulieren zum Beispiel die Transkription von Genen, die in den Metabolismus von Gallensäuren und Lipoproteinen involviert sind, über Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR). Makishima et al. zeigten, dass vor allem die primäre Gallensäure Chenodeoxycholsäure (CDCA) als Ligand den nukleären Farnesoid X Rezeptor aktiviert. Dies hat zum einen die Repression der Transkription von Cholesterin-7 α -Hydroxylase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Gallensäurensynthese, zur Folge. Zum anderen wird die Transkription des I-BABP-Gens (*intestinal bile acid-binding protein*) aktiviert, das für ein cytosolisches Gallensäuren-Bindungsprotein in intestinalen Enterozyten codiert [125]. Außerdem konnte unter verschiedenen Bedingungen, wie beispielsweise bei PBC-Patienten oder mit Gallensäuren gefütterten Mäusen, gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen an Gallensäuren die Transkription und Expression der Gallensäuretransporter in den Hepatozyten verändern. Mit Ursodeoxycholsäure (UDCA) und Cholsäure (CA) gefütterte Mäuse erhöhen die Expression von kanalikulären und verringern die Expression von basolateralen Gallensäuretransport-Proteinen. So induziert UDCA die Herabregulation von Oatp1 (*organic anion transporting polypeptide 1*), CA sogar von Oatp1 und Ntcp (*Na-taurocholate cotransporting polypeptide*). Im Gegenzug werden die Gene von Bsep (*bile salt export pump*) und Mrp2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) nach UDCA- und CA-Fütterung verstärkt exprimiert. Der Transporter Mdr2 (*multidrug resistance protein 2*) erfährt keine Modulation der Expression [54]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Modulation der Expression von Bsep durch die Gallensäuren CA und UDCA in damit gefütterten Mäusen von FXR abhängig sind, wohingegen die anderen Proteine der ABC Transporter (*ATP binding cassette*), wie etwa die Konjugatexportpumpe Mrp2, unabhängig von FXR in Leber, Niere und Darm von Mäusen exprimiert werden [232]. Dass durch erhöhte Gallensäurenkonzentrationen sogar apoptotische Gene differenziert exprimiert werden, haben mehrere Veröffentlichungen gezeigt. Gallengangsligierte Ratten

weisen eine erhöhte Expression der antiapoptotischen Proteine cIAP2, A1 und Bcl-2 auf [183], [108]. Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen von PBC-Patienten zeigen ebenfalls eine verstärkte Bcl-2 Expression verglichen mit Zellen von Gesunden [101].

Da bekannt ist, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B, durch Gallensäuren in ihrer Aktivität beeinflusst werden, wurde der Aspekt der Modulation der Transkription in den HepG2-Ntcp Zellen nach GCDCA-Stimulation in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Zuerst wurde der Einfluss von Sulfasalazin, einem Modulator von NF- κ B, auf die Gallensäuren-induzierte Apoptose ermittelt. Der weiterführende Transkriptionsscreen von 500 „apoptotischen Genen“ zeigte eine deutliche Hochregulation von wenigen Genen. Da zwei Komponenten des AP-1 Transkriptionskomplexes verstärkt exprimiert wurden, und GCDCA zugleich JNK aktiviert, wurde der AP-1 Transkriptionsfaktor eingehender untersucht.

4.2.1. Einfluss von Sulfasalazin auf die GCDCA-vermittelte Apoptose

Sulfasalazin moduliert die Induktion von Apoptose und die Aktivität von NF- κ B in unterschiedlichen Zelllinien Zelltyp-spezifisch. Die Wirkung von Sulfasalazin auf Hepatozyten ist noch unbekannt. In T-Lymphozyten induziert Sulfasalazin Caspase-abhängig und Caspase-unabhängig Apoptose [119]. In primären humanen Synoviozyten und der Kolonkarzinomzelllinie SW620 konnte Sulfasalazin keine Apoptose induzieren [119]. In humanen Glioma- und Kolonkarzinomzellen hingegen inhibiert Sulfasalazin die Fas-vermittelte Apoptose bei gleichzeitiger Sensibilisierung der Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose. Ähnlich verhält sich auch die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 [77]. In den Kolonkarzinomzellen HCT166 konnte Sulfasalazin die Fas-vermittelte Apoptose verhindern, die TRAIL-induzierte Apoptose allerdings nicht beeinflussen [77]. Die Wirkung von Sulfasalazin ist sowohl Zelltyp- wie auch Stimulus-abhängig.

In der humanen Hepatomzelllinie HepG2-Ntcp verhindert Sulfasalazin sehr effizient die Apoptoseinduktion durch GCDCA-Inkubation. Die Aktivitäten der Caspasen-8, -9, -3 und -7 werden durch Sulfasalazin dosisabhängig reduziert (Dissertation Kris

Bauchmüller, Med. II, Klinikum Großhadern, LMU München; Abbildung 30, Abbildung 31, Abbildung 32, Abbildung 34 und Abbildung 35). Isolierte primäre Maushepatozyten zeigen ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion der Apoptoserate nach GCDCA-Stimulation durch gleichzeitige Inkubation mit Sulfasalazin (Abbildung 33). Die Untersuchung der Generierung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS, *reactive oxygen species*) bewies ebenfalls eine dosisabhängige Reduzierung der ROS durch Sulfasalazin (Tabelle 6 und Tabelle 7). Die Rolle der ROS bei der Gallensäuren-abhängigen Apoptose ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Sie können sowohl Ursache als auch Folge der mitochondrialen Schädigung sein [164, 193]. Interessanterweise wurde über eine antioxidative Wirkung von Sulfasalazin bereits berichtet [9, 136].

Experimente in HepG2-Ntcp Zellen mit den beiden Komponenten Sulfapyridin (SPD) und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) zeigen keine Beeinflussung der GCDCA-induzierten Apoptose (Dissertation Kris Bauchmüller, Med. II, Klinikum Großhadern, LMU München, Abbildung 36 und Abbildung 37). Diese Ergebnisse überraschen nicht, da schon Versuche an anderen Zelllinien gezeigt haben, dass Sulfasalazin zelluläre Mechanismen beeinflusst, gegen die die Einzelkomponenten keine Wirkung zeigen. So konnte nur Sulfasalazin, nicht aber SPD oder 5-ASA, in T-Lymphozyten Apoptose induzieren oder in Kolonepithelzellen die Aktivierung von NF- κ B inhibieren [118, 222, 225].

Inkubation von Sulfasalazin mit der proapoptotischen Substanz Staurosporin, die Apoptose Mitochondrien- und Caspase-abhängig induziert, beweist, dass Sulfasalazin auch Gallensäuren-unabhängige Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen verhindern kann (Abbildung 38).

Die von Sulfasalazin inhibierten Apoptosesignalwege sind folglich in Hepatozyten nicht Gallensäuren-spezifisch. Weitergehende Untersuchungen zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der in Hepatozyten Überlebenswege reguliert, in Hepatozyten tatsächlich durch Sulfasalazin induziert wird (Abbildung 39 und Abbildung 40). In anderen Zelllinien, wie etwa T-Lymphozyten oder Kolonkarzinomzellen, inhibiert Sulfasalazin dagegen NF- κ B und induziert Apoptose [118, 225]. Dies zeigt abermals, dass der Effekt von Sulfasalazin Zelltyp-spezifisch

ist. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen mit nicht-steroidalen antiinflammatorischen Substanzen (NSAID). Diese hemmen in vielen Zelltypen NF- κ B, wohingegen sie in Hepatozyten und HepG2-Zellen die NF- κ B-Aktivität nicht beeinflussen können [25].

Nachdem Sulfasalazin den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, ist die Wirkung dieser Substanz auf andere Proteine, die sowohl die Apoptose als auch das Überleben regulieren, interessant. Die MAP Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) modulieren die Aktivität vieler Proteine dieser Signalkaskaden durch Phosphorylierung an Serin oder Threonin und bestimmen so das Zellschicksal mit [221]. Sowohl die JNK (cJun N-terminale Kinase) als auch die p38 MAPK werden durch GCDCA-Stimulation von HepG2-Ntcp Zellen aktiviert. Diese Aktivierung wird durch die gleichzeitige Stimulation mit Sulfasalazin gehemmt (siehe Abbildung 41 und Abbildung 42). Erk 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) zeigen keine veränderte Aktivität durch Stimulation mit GCDCA in An- und Abwesenheit von Sulfasalazin. Obwohl die JNK zuerst als Regulator der Proliferation und Differenzierung bekannt geworden ist, wird ihr zunehmend eine Funktion als Apoptosemediator zuerkannt [37]. Sie wird durch verschiedene Stimuli, wie Cytokine, ROS oder Gallensäuren, aktiviert und phosphoryliert daraufhin unterschiedliche Proteine. Zu ihren Substraten zählt nicht nur cJun, sondern auch JunB, JunD oder das proapoptotische Bcl-2 Protein Bid [37, 45]. Wahrscheinlich werden weitere, bis jetzt nur noch nicht identifizierte, Substrate phosphoryliert.

Untersuchungen an Hepatozyten zeigen, dass allein die Inhibierung von NF- κ B genügt, um das TNF- α -induzierte Proliferationssignal in ein Signal zur Apoptoseinduktion umzuwandeln [227]. In einer nicht transformierten Rattenhepatozytenzelllinie konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von NF- κ B die transiente Aktivierung von JNK durch TNF- α in eine andauernde Aktivierung konvertiert [121]. Diese permanente JNK-Aktivierung durch TNF- α oder Gallensäuren wie Tauroolithocholat-Sulphat induziert die AP-1-vermittelte Transkription, die wiederum Apoptose auslösen kann [66, 121]. Die Gallensäure Tauroursodeoxycholat (TUDCA) hingegen reduziert die JNK-Aktivität, was zu ihrer cytoprotektiven Wirkung beitragen könnte [172].

Sulfasalazin induziert die NF- κ B Aktivierung und eine JNK-Inhibierung. Dies kann zur Blockade der Apoptosekaskade führen. Zusammenfassend ergibt sich das in Abbildung 72 dargestellte Modell des Effektes von Sulfasalazin bei der GCDCA-vermittelten Apoptose.

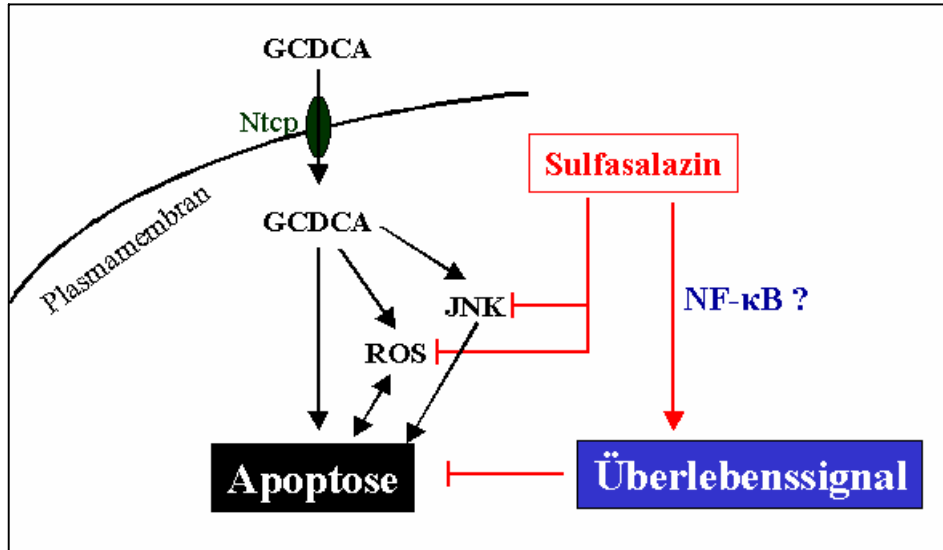


Abbildung 72: Modell des cytoprotektiven Einflusses von Sulfasalazin bei der GCDCA-induzierten Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen.

4.2.2. Transkriptionsscreen und Bestätigung mittels quantitativer RT-PCR

Die neuartige DNA-Microarray-Technologie bietet die Möglichkeit viele hunderte bis tausende Gene bezüglich ihrer Transkription in unterschiedlich behandelten Proben oder unterschiedlichen Geweben in nur einem Experiment zu untersuchen. Auf dem verwendeten *PIQOR Cell Death* Microarray der Firma Memorec sind 500 humane Apoptose-spezifische cDNAs je 4-fach gespottet. Die meisten angebotenen Genchips weisen wesentlich mehr Gene auf - 200.000 unterschiedliche cDNAs sind keine Seltenheit. In dieser Arbeit wurde bewusst ein kleinerer und für die Apoptose spezifischer Chip ausgewählt. Da es nur zulässig ist, zwei Proben, die auf einem Chip hybridisiert wurden, zu vergleichen, wurden 2 Arrays durchgeführt. So konnte zum einen die Modulation der GCDCA-Inkubation mit nicht stimulierten Zellen verglichen werden und zum anderen der Einfluss der simultanen Gabe von Sulfasalazin untersucht werden.

Die Auswertung der Signale zeigt, dass 8,5 % der Gene in ihrer Expression hoch- oder herabreguliert wurden, d.h. einen Quotienten über 1,4 bzw. unter 0,7 aufwiesen. Bei vier Genen veränderte sich die Transkription mindestens um den Faktor 2. Interessanterweise sind zwei davon Mitglieder des AP-1 Transkriptionskomplexes, die sogar zusammen einen funktionellen Komplex ausbilden können. Darüber hinaus werden weitere Transkriptionsfaktoren oder Proteine, die mit Transkriptionsfaktoren interagieren und diese modulieren, nach der Stimulation differenziert transkribiert. Dies weist darauf hin, dass die Modulation der Transkription ein Schlüsselmechanismus für die Gallensäuren-induzierte Apoptose sein könnte.

Es wurden auch einige Bcl-2 Proteine, wie Bcl-X_L, Puma, Mcl1 und Bmf, unterschiedlich transkribiert. In der vorliegenden Arbeit wurde vorerst nur Bcl-X_L weiter untersucht. Auch die Modulation der Transkription anderer Bcl-Proteine könnte aber für die GCDCA-vermittelte Apoptose von Bedeutung sein. Auffällig war zudem, dass Kinasen, die den MAPK vorgeschaltet sind (MAPK4 und MAPKKK5) durch die GCDCA-Stimulation verglichen mit nicht stimulierten Zellen kaum beeinflusst werden. Die gleichzeitige Stimulation mit Sulfasalazin aber induziert eine verstärkte Transkription dieser Gene. Da die Western-Blots gegen die aktivierten MAPK

ebenfalls eindeutige Unterschiede zwischen mit GCDCA allein und mit GCDCA und Sulfasalazin behandelten Zellen zeigen, könnten die MAPK bei der Sulfasalazin-vermittelten Inhibierung der Apoptose beteiligt sein. Dieser Signalweg sollte daher in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden.

Da der Microarray nur semi-quantitative Aussagen über die Veränderung der Transkription zulässt, wurde die Transkription der Gene mittels quantitativer RT-PCR unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Das Ergebnis des Microarrays konnte nur bei dem Gen Bcl-X_L nicht bestätigt werden. Allerdings waren hier sowohl das Signal des Arrays, als auch das Ergebnis der RT-PCR nur gering verändert. Im Array und der quantitativen RT-PCR war das am stärksten veränderte Gen cFos. Die Arbeitsgruppe um Di Toro zeigte ebenfalls eine verstärkte Transkription des cFos-Genes nach Inkubation der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit unterschiedlichen Gallensäuren. Stimulation der Caco-2 Zellen mit 250 µM Chenodeoxycholsäure (CDCA), 250 µM Deoxycholsäure (DCA) oder 250 µM Lithocholsäure (LCA) für 1h ruft bei CDCA eine 2,5-fache bzw. bei DCA und LCA eine 2-fache Steigerung des mRNA Gehaltes verglichen mit nicht stimulierten Zellen hervor [43]. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR der anderen Gene entsprachen annähernd denen des Arrays und schwankten um den Faktor 1,5 bis 4.

Zur weiterführenden Untersuchung der biologischen Konsequenz der modifizierten Transkription wurden die beiden Komponenten des AP-1 Transkriptionskomplexes, cFos und JunB, sowie Bcl-X_L ausgewählt.

4.2.3. Bcl-X_L

Bcl-X_L ist ein antiapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie. Es befindet sich an der äußeren mitochondrialen Membran und verhindert den Austritt der proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien, indem es mit proapoptotischen Bcl-2 Proteinen Dimere bildet und diese dadurch inaktiviert [70]. Eine GCDCA-induzierte Verminderung des Bcl-X_L Proteingehaltes würde die Apoptoseinduktion erleichtern. Die nur schwach verringerte Transkription des Bcl-X_L-Gens spiegelt sich allerdings nicht im Proteingehalt der Zellen wieder. Das Protein Bcl-X_L weist eine sehr lange Halbwertszeit von mehr als 12h auf [96, 187], doch auch längere Exposition der Zellen mit GCDCA verändert den Proteingehalt von Bcl-X_L nicht (Abbildung 57 und Abbildung 58). Eventuell verändert GCDCA im verwendeten Modell den mRNA-Gehalt nur kurzfristig, so dass wegen der langen Halbwertszeit von über 12h eine relevante Modulation auf Proteinebene nicht beobachtet wird. Die starke Apoptoseinduktion der GCDCA in den HepG2-Ntcp Zellen und die Stimulation im Medium ohne Zusätze, d.h. auch ohne Zugabe von Serum, beeinflusst, vor allem bei langen Inkubationszeiten, die Expression der Zellen zusätzlich. Dies verdeutlicht die Komplexität der Proteinexpression in Zellen. Eine veränderte Transkription bedingt keine veränderte Translation und keine Änderung auf Proteinebene. Die Zellen besitzen viele Regulationsmechanismen, wie Häufigkeit der Translation einer mRNA, Stabilität der mRNA, Ubiquitinierung und Degradierung des Proteins, um den Spiegel eines spezifischen Proteins den Bedürfnissen anzupassen.

4.2.4. AP-1

Die weiterführenden Experimente zeigen eindeutig, dass die AP-1 Proteine cFos und JunB nach GCDCA-Stimulation der HepG2-Ntcp Zellen verstärkt transkribiert werden. Des Weiteren hat GCDCA einen positiven Effekt auf die Aktivität dieses Transkriptionskomplexes. Überexpression der unterschiedlichen AP-1 Komponenten einzeln oder in Kombination verändert die GCDCA-induzierte Apoptoserate nicht, wohingegen die Inkubation mit dem AP-1-Inhibitor Curcumin die Gallensäurenvermittelte Apoptose dosisabhängig blockiert.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist in die Regulation von vielfältigen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Transformation und Zelltod, involviert. AP-1 besteht nicht aus einem Protein, sondern stets aus einem Dimer, mit Proteinen der Jun-, Fos-, ATF- (*activating transcription factor*) oder MAF- (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) Proteinfamilie. Die wichtigsten Vertreter der Jun-Familie sind die Proteine cJun, JunB und JunD; die der Fos Familie cFos, FosB, Fra-1 und Fra-2. Die Jun-Proteine können Homo- und Heterodimere ausbilden, wohingegen die Fos-Proteine nur zusammen mit den Jun-Proteinen Heterodimere formen können. Alle AP-1 Proteine gehören zur Gruppe der bZIP-Proteine (*basic leucine zipper*); sie besitzen eine Leucin-Zipper-Domäne, über die sie Dimere bilden können und eine sehr basische Region, mit der sie an die DNA binden. AP-1 erkennt spezifische DNA-Sequenzen: TRE (*12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) response element*) mit der Konsensussequenz 5`-TGAG/CTCA-3` und CRE (*cAMP response element*) mit der Sequenz 5`-TGACGTCA-3` [188].

Die Regulationen und Funktionen von AP-1 innerhalb der Zelle sind komplex und noch kaum verstanden. Überexpression von cFos und cJun in Mäusen bewirkt eine Transformation, wobei die Überexpression von cFos vor allem zu Knochenkrebs durch Transformation von Chondroblasten und Osteoblasten führt. cJun ist vor allem bei der Entwicklung von Haut- und Lebertumoren beteiligt. JunB hingegen hat keine transformierende Wirkung [50]. Versuche in der SHE (Syrian hamster embryo) Zelllinie und der humanen RKO (colorectal carcinoma) Zelllinie zeigten allerdings, dass cFos Apoptose in diesen Zellen induziert [152]. Weitere *in vitro* Versuche bewiesen, dass eine gesteigerte Aktivität von AP-1 Apoptose in verschiedenen Zelllinien, darunter humane Tumorzellen, auslösen kann [188]. Die Komplexität und Spezifität der Folgen einer AP-1 Aktivierung können am Beispiel des cJun Proteins gezeigt werden. In Neuronen induziert eine gesteigerte cJun-Aktivität Apoptose *in vitro*. In Lebertumorzellen hingegen verhindert cJun nicht nur die p53-vermittelte Apoptose, sondern ist auch für das Überleben von fetalen Hepatozyten unentbehrlich – in cJun defizienten Embryos gehen Hepatozyten spontan in Apoptose [50]. Es wurden bisher viele Apoptosevorgänge aufgedeckt, bei denen die AP-1 Aktivierung wichtig ist. Ihre Funktion bei der Vermittlung des Überlebens von Zellen scheint aber gleichbedeutend wichtig zu sein. Die Beurteilung der Funktion von AP-1 sollte immer den zellulären Kontext, also auch andere Transkriptionsfaktoren und

Signaltransduktionswege, einbeziehen. Wahrscheinlich bestimmt dieser, welche Gene von AP-1 transkribiert werden. Bisher sind schon zahlreiche AP-1 regulierte Apoptose-spezifische Gene bekannt. Einige wichtige Vertreter sind p53, Fas-Ligand, Fas und die Bcl-2 Proteine Bim, Bcl-2, Bcl-3 und Bcl-X_L [50]. Man vermutet, dass abhängig vom Zelltyp und der Situation entweder pro- oder antiapoptotische Gene abgeschrieben werden, so dass AP-1 sowohl die Apoptose als auch das Überleben unterstützen kann.

Die Dimerkomposition von AP-1 wird je nach physiologischen und pathophysiologischen Konditionen innerhalb der Zellen angepasst. Alle Dimere binden an die Konsensussequenz, doch es gibt wohl Unterschiede in der Bindung spezifischer AP-1 Erkennungsstellen in unterschiedlichen Promotoren, in der Stabilität der DNA-Bindung und in der Transaktivierungseffizienz [94]. Die funktionelle Konsequenz einer Änderung in der Untereinheitenkomposition ist noch kaum verstanden. Durch GCDCA-Stimulation von HepG2-Ntcp Zellen werden die beiden Proteine cFos und JunB verstärkt transkribiert (Tabelle 8, Abbildung 52 und Abbildung 53). Dies könnte die Dimerkomposition der AP-1 Komplexe verändern. Beide Proteine können sogar gemeinsam einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor ausbilden. Die Konsequenz daraus ist bislang unbekannt. Es gibt auch in der Literatur keine Informationen über AP-1 Dimere bestehend aus cFos/JunB und deren Folgen für Zellen im Allgemeinen oder für Leberzellen unter Apoptosestimulus im Speziellen. Wirkt dieser Komplex antiapoptotisch oder verstärkt er die Apoptoseinduktion? Werden vor allem pro- oder antiapoptotische Gene transkribiert? Ist die Ausbildung von cFos/JunB-Dimeren bzw. die Modulation der AP-1 Dimerkomposition für die GCDCA-induzierte Apoptose essentiell? Wird dadurch AP-1 aktiviert? Um einige dieser Fragen zu beantworten, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Da die Regulation von AP-1 aber noch komplexer als die Dimermodulation ist, wird sie zuerst – in Grundzügen - zusammengefasst. Wie wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 reguliert? Die Regulation kann auf mehreren Ebenen vonstatten gehen: Auf Ebene der Dimerkomposition, der Transkription, der Translation und der Interaktion mit anderen Proteinen.

Dass die Dimerkomposition wahrscheinlich die Auswahl der transkribierten Gene mitbestimmt, wurde durch Versuche mit Mutanten von AP-1 Proteinen gezeigt, deren Leucin-Zipper-Domäne nur noch eine Dimerkomposition zuließ [215].

Die zweite Ebene, über die die AP-1 Aktivität auch in den GCDCA-stimulierten HepG2-Ntcp Zellen reguliert wird, ist die Transkription (Tabelle 8, Abbildung 52 und Abbildung 53). Viele Stimuli induzieren eine verstärkte, aber transiente Produktion von AP-1 mRNA. Die transkriptionelle und post-translationale Regulation von AP-1 wird durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen bestimmt (siehe Abbildung 73). AP-1 wird durch mehrere externe Stimuli induziert, die die MAPK-Aktivität steigern. Vor allem die Expression von cFos wird durch TCF (*ternary complex factors*) induziert, die wiederum durch Phosphorylierung über den ERK-MAPK-Signalweg aktiviert werden. Neben den ERKs sind auch die p38MAPK und die JNK in die Aktivierung von AP-1 involviert. Sie stimulieren mehrere Transkriptionsfaktoren, wie MEF2C (*myocyte-enhancer factor 2C*), ATF2 (*activating transcription factor 2*) und Jun, die die Transkription der Fos- und Jun-Gene induzieren. Die mRNA wird translatiert, so dass sich AP-1 Komplexe ausbilden. Diese binden an Gene mit AP-1 Bindestellen im Promotor und induzieren deren Transkription. Eine weitere regulatorische Modulation besteht in der Phosphorylierung der AP-1 Komplexe durch ERK 1/2, JNK, p38MAPK, Casein Kinase 2 (CK2), Glycogen-Synthetase-Kinase-3 β (GSK-3 β) oder ribosomale S6 Kinase 2 (RSK2). Die Phosphorylierung verändert die Transaktivierungseffizienz und die DNA-Bindungsaktivität [50]. Die konkreten Konsequenzen für die AP-1 Aktivität und die Transkriptionsregulation der zellulären Proteine ist noch unklar.

Die letzte Ebene der AP-1 Regulation, die Interaktion mit weiteren Proteinen, ist ebenfalls noch nicht entschlüsselt. Es wurden schon einige Proteine gefunden, die mit den AP-1 Komponenten interagieren und deren transkriptionelle Aktivität regulieren. Die Zahl der identifizierten, potentiellen Interaktionspartner steigt permanent an. Viele sind nukleäre Rezeptoren, wie der Glucocortikoidrezeptor (GR) oder der Retinolsäure-Rezeptor (RAR) [3, 78]. Ein eindeutiger Zusammenhang besteht auch zwischen AP-1 und dem RAS-Signalweg während der Transformation [127].

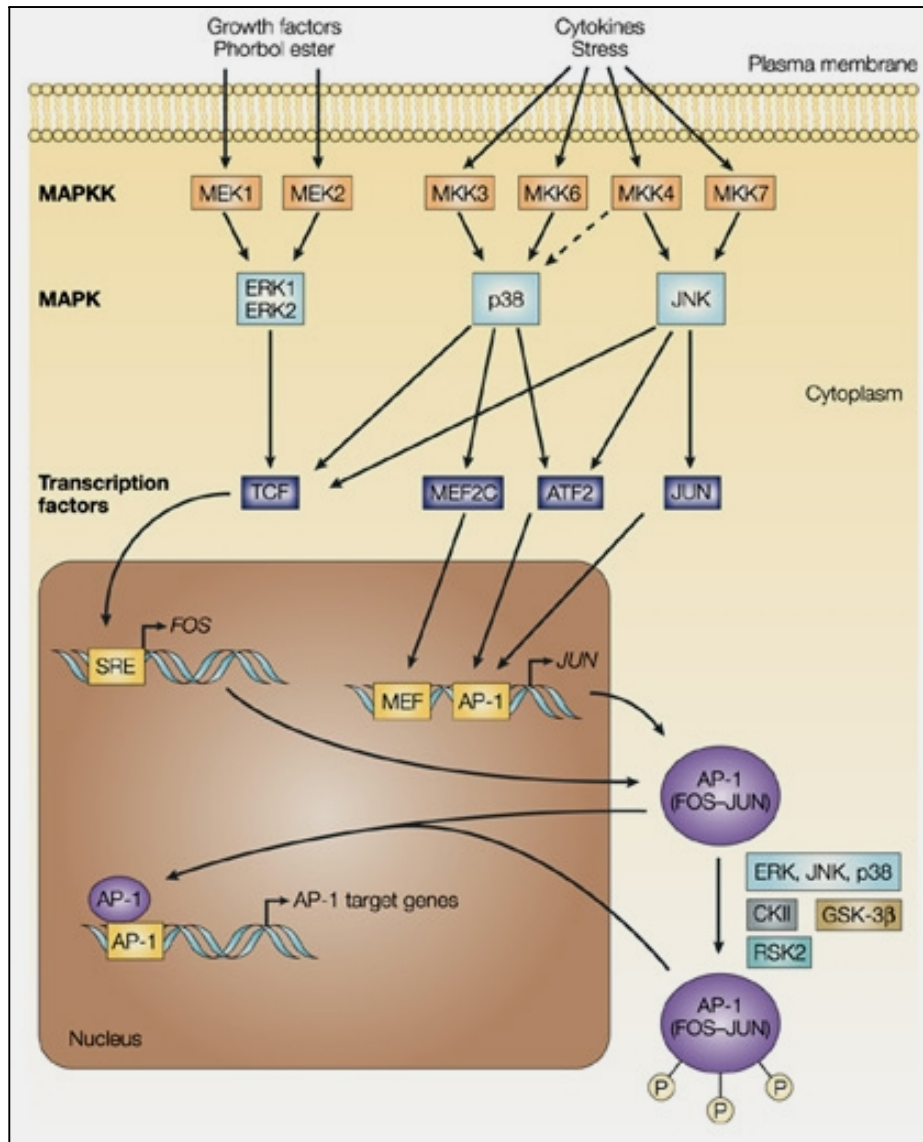


Abbildung 73: Transkriptionelle und post-translationalen Aktivierung von AP-1. Die AP-1 Aktivität wird über ein komplexes Netzwerk aus Signaltransduktionswegen, das auch die MAP Kinasen mit ERK, p38MAPK und JNK involviert, stimuliert. Gestrichelter Pfeil zeigt, dass die Phosphorylierung der p38MAPK durch die MKK4 noch umstritten ist. Die MAPK aktivieren viele Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von Fos und Jun induzieren. Fos und Jun Proteine bilden AP-1 Komplexe und aktivieren die Transkription bestimmter Gene. Posttranslationale Phosphorylierung von AP-1 durch unterschiedliche Kinasen verändert das Transaktivierungspotential, die DNA-Bindekapazität und die Stabilität der AP-1 Dimere (aus [50]).

Welchen Einfluss hat die Gallensäure GCDCA auf den AP-1 Komplex in HepG2-Ntcp Zellen? GCDCA erhöht die Transkription der AP-1 Komponenten cFos und JunB und beeinflusst die Aktivität von AP-1 positiv. Der EMSA zeigt eine maximale AP-1 Bindung nach 30 minütiger Stimulation mit GCDCA (75 μ M). Nach 2h liegt diese nur noch gering über der der nicht stimulierten Zellen (Abbildung 59). Ähnliche Ergebnisse erhielten Makino et al., als sie die humane Kolonkarzinomzelllinie LoVo

mit der Gallensäure Chenodeoxycholsäure (CDCA) stimulierten. Diese Zellen zeigten eine verstärkte AP-1 Bindung im EMSA, wohingegen NF- κ B durch die CDCA-Inkubation nicht beeinflusst wurde [83]. Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay in den HepG2-Ntcp Zellen unterstützt das Ergebnis des EMSAs und zeigt eine Steigerung der AP-1 Aktivität um 40% durch Stimulation mit GCDCA (Abbildung 60). Da die einzelnen Werte der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase sehr schwankten, erreicht die Erhöhung allerdings keine Signifikanz. Womöglich bindet das Dimer mit den durch die GCDCA-Stimulation vornehmlich transkribierten Proteinen, cFos und JunB, vor allem an modifizierte AP-1 Bindestellen und nicht spezifisch an die AP-1 Bindestelle im verwendeten Kollagenase-Promotor. Dies könnte die geringe Erhöhung erklären. So zeigten Pyrzynska et al., dass AP-1 Komplexe, die während apoptotischer Vorgänge in Gliomazellen gebildet werden, unterschiedliche Transaktivierungspotentiale gegenüber verschiedenen Promotoren aufweisen. Diese AP-1 Dimere verringern die TRE-/Kollagenase-abhängige Transkription und verstärken die des Fas-Ligand-Promotors [155].

Die spezifischen Funktionen der einzelnen AP-1 Komponenten sind noch nicht entschlüsselt. JunB scheint der Gegenspieler von cJun zu sein. cJun ist zum Beispiel ein positiver Regulator des Zellzyklus, JunB ein negativer. cJun wird bei der Ras-vermittelten Transformation aktiviert und induziert die Transkription bestimmter Gene. Dominant negative Mutanten von cJun verhindern die Transformation durch Ras-Überexpression in Fibroblasten [123, 202]. JunB hingegen induziert die Transkription des p16^{INK4a} Gens, das für den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p16 codiert und die Ras- oder Src-vermittelte Transformation in Mäusen verhindert [150]. Doch welche Konsequenzen hat ein Dimer aus cJun und JunB in Hepatozyten? Welche ein Dimer aus cFos und JunB? Um die Auswirkungen auf die AP-1 Aktivität in HepG2-Ntcp Zellen zu erforschen, wurden diese Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden einzeln und in Kombination transfiziert. Zusätzlich wurden die Plasmide zur Durchführung eines Reporter-Gen-Assay cotransfiziert. Stimuliert wurden die Zellen entweder nicht, um zu sehen, wie hoch die AP-1 Aktivierung ausschließlich aufgrund der Überexpression ist, oder mit dem AP-1 Aktivator PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat). Dieser Versuch verdeutlicht, dass die Überexpression von cJun oder cFos allein die AP-1 Aktivität enorm steigert, wohingegen JunB oder die cJun-Mutante TAM67 die AP-1 Aktivität nicht beeinflussen. Die Ergebnisse aus der

Kombination von cJun und JunB zeigen, dass JunB in Hepatozyten die cJun-induzierte Erhöhung der AP-1 Aktivität antagonisiert. Die publizierte Funktion von JunB bezüglich der Interaktion mit cJun konnte bestätigt werden. Anders sind die Auswirkungen der JunB und cFos Überexpression. Die simultane Erhöhung beider Proteinexpressionen steigert die AP-1 Aktivität verglichen mit scheintransfizierten und cFos transfizierten Zellen weiter. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass beide Proteine tatsächlich einen funktionierenden, aktiven AP-1 Komplex ausbilden können. Interessant sind auch die Kombinationen der AP-1 Proteine mit der cJun Mutante TAM67. TAM67 reduziert nur die Erhöhung der cJun-Überexpression auf den Level der scheintransfizierten Zellen. cFos und JunB verhalten sich bei alleiniger Überexpression oder Cotransfektion mit TAM67 gleich. Dies zeigt, dass in Hepatozyten die cFos-induzierte AP-1 Aktivierung unabhängig von cJun stattfindet – und durch JunB verstärkt werden kann (Abbildung 62).

Hat die verstärkte Transkription und Expression der AP-1 Komponenten Auswirkungen auf die GCDCA-vermittelte Apoptose? Zur Klärung dieser Frage wurden die HepG2-Ntcp Zellen mit den AP-1 Expressionsplasmiden und TAM67 einzeln und in Kombination transfiziert. Alle Zellen, egal ob scheintransfiziert oder mit einem AP-1 Expressionsplasmid allein bzw. zusammen mit TAM67 transfiziert, reagierten auf GCDCA Stimulation mit einer Apoptoserate von etwa 20%. cJun Überexpression zeigte die höchste Apoptoserate mit 21,3%; TAM67 die geringste mit 16,4% nach GCDCA Stimulation (Abbildung 63). Keines der Proteine zeigte nach Überexpression eine anti- oder proapoptotische Wirkung. Dies ist insofern verwunderlich, da für cFos bereits eine proapoptotische Wirkung, und für cJun sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte, publiziert sind [128, 152]. Vielleicht eignet sich das verwendete Modell nicht, um die spezifische Aktivierung der einzelnen Komponenten künstlich zu erreichen, so dass die zellulären Prozesse während der Apoptose modifiziert werden. Im Reporterassay wurde bewiesen, dass bereits nur die Überexpression, ohne zusätzliche Stimulation, die AP-1 Aktivität erhöht. Möglicherweise wird die AP-1 Regulation aber auf anderen Ebenen durch die Apoptosestimulation mittels GCDCA-Inkubation moduliert.

Der zweite Weg den Effekt des Transkriptionsfaktors AP-1 auf die GCDCA-induzierte Apoptose zu untersuchen, ist die Inhibierung des Komplexes, zum Beispiel mit dem

AP-1 Inhibitor Curcumin, dem gelben Pigment aus *Curcuma longa*, der Gelbwurz. Eine extensive Forschung in den letzten Jahrzehnten zeigt, dass Curcumin in manchen Zellen, vor allem in Tumorzellen, Apoptose induziert, wohingegen es in anderen, vor allem in primären Zellen, inaktiv ist oder die Proliferation hemmt ohne Apoptose zu induzieren. Es zeigt anti-kanzerogene, anti-inflammatorische, anti-septische und anti-oxidative Effekte [48]. Mehrfach bewiesen wurde, dass Curcumin AP-1 inhibiert [89]. Außerdem scheint es die Expression von cJun und cFos in JB6 Zellen und Mausfibroblasten zu reduzieren [124]. Curcumin kann sogar den Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung der JNK, der p38MAPK oder der ERKs führt, in unterschiedlichen humanen Zelllinien und bei muriner Colitis inhibieren [48]. Untersuchungen der AP-1 Bindung im EMSA nach Stimulation von HepG2-Ntcp Zellen mit dem AP-1-Aktivator PMA in An- und Abwesenheit von Curcumin zeigen, dass das Pigment aus *Curcuma longa* in 50 µM Konzentration die Bindung des AP-1 Komplexes an das spezifische Oligonukleotid verhindert (Abbildung 64). Die transkriptionelle Aktivität von AP-1 im Reportergen-Assay wird im selben System durch Curcumin dosisabhängig inhibiert (Abbildung 65).

Welche Auswirkung hat die Inhibition von AP-1 durch Curcumin auf die HepG2-Ntcp Zellen? Wird die GCDCA-vermittelte Apoptose verstärkt oder inhibiert? Die Arbeitsgruppe um Jiang zeigte in mehreren humanen Tumorzellen, darunter auch HepG2-Zellen, dass 30 µM Curcumin Apoptose induzieren können [91]. Versuche mit der cytotoxischen, Apoptose-induzierenden Substanz Methylenglyoxal (MG) in HepG2-Zellen hingegen bewiesen eine antiapoptotische Wirkung von Curcumin. Die simultane Gabe verhinderte das Austreten von Cytochrom c, die Generierung von reaktiven Sauerstoffintermediaten, die Aktivierung von Caspase-3 und die Proteolyse von PARP [30]. Die in dieser Dissertation durchgeführten Versuche widersprechen ebenfalls den Aussagen von Jiang. Curcumin induziert in HepG2-Ntcp Zellen keine Apoptose. Es verhindert sowohl die GCDCA- als auch die TLCA- induzierte Apoptose dosisabhängig, wobei die Spezifität von Curcumin als AP-1 Inhibitor noch nicht vollständig geklärt ist (Abbildung 66). Die Gallensäureaufnahme wird als ein möglicher Mechanismus der Inhibition der Gallensäuren-induzierten Apoptose von Curcumin nicht beeinflusst (Abbildung 67).

Curcumin wird bereits in vielen klinischen Studien auf seine anti-kanzerogene Wirkung getestet. Dabei wird es oral verabreicht. Dosen von bis zu 8 g/Tag über einen Zeitraum von 3 Monaten sind nicht toxisch [117]. In einer Studie wurde 12 Patienten mit kolorektalem Karzinom und hepatischen Metastasen eine Woche vor der Operation täglich eine Dosis von 450 bis 3600 mg Curcumin gegeben. Curcumin wird nach oraler Administration allerdings nur schlecht absorbiert, so dass es in der Leber nicht nachweisbar war. In der peripheren und portalen Zirkulation waren nur nanomolare Mengen der Substanz selbst oder deren Glucuronyl- oder Sulfatkonjugate zu detektieren. Die Curcuminkonzentration blieb weit unter einer pharmakologisch wirksamen Dosis, weshalb auch keine Unterschiede zwischen Patienten, die Curcumin erhalten hatten und der Kontrollgruppe nachweisbar waren [59]. Eine weitere Studie zeigt, dass die durchschnittlichen Serumkonzentrationen bei $0,51 \pm 0,11 \mu\text{M}$, $0,63 \pm 0,06 \mu\text{M}$ und $1,77 \pm 1,87 \mu\text{M}$ nach der Einnahme von 4, 6 und 8 g Curcumin/Tag lagen. Die Konzentration war 1 – 2h nach Einnahme am höchsten und nahm in den folgenden 12h kontinuierlich ab [33]. In humaner kolorektaler Mucosa wurden Curcuminkonzentration von 10 nM/g Gewebe nach oraler Einnahme von 3600 mg gefunden. Diese Mengen können pharmakologische Wirkung zeigen. Bei der Prävention und Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen, wie z.B. kolorektalen Tumoren, sollte Curcumin in weiteren klinischen Studien getestet werden [59]. Aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit finden sich nach oraler Administration nur Spuren von Curcumin und dessen Metabolite in der portalen Zirkulation und in der Leber. Mengen, die weit unter der pharmakologisch wirksamen Konzentration liegen. Deshalb wird oral verabreichtes Curcumin für Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen wahrscheinlich nicht nützlich sein. Da es die GCDCA-vermittelte Apoptose *in vitro* sehr effizient hemmt und keine Nebenwirkungen von Curcumin bekannt sind, könnte es dennoch ein viel versprechendes Agens zur Behandlung der Cholestase, der PBC oder der PSC sein. Dabei muss die schlechte intrahepatische Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe aber umgangen werden. Die Curcuminkonzentration nach intramuskulärer oder intravenöser Administration wurde bisher noch nicht untersucht.

4.2.5. Bedeutung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Modulation der Transkription eine essentielle Funktion während der Gallensäuren-vermittelten Apoptose in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 zukommt. Es wurde dargelegt, dass die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 in die Gallensäuren-vermittelte Apoptose involviert sind. GCDCA induziert die Transkription der AP-1 Komponenten cFos und JunB und beeinflusst die AP-1 Aktivierung positiv. Folglich könnte die GCDCA-vermittelte Hochregulation von AP-1-abhängigen Genen die zytotoxische Wirkung dieser Gallensäure vermitteln. Es wurde weiterhin verdeutlicht, dass sowohl Sulfasalazin, eine Substanz, die den Transkriptionsfaktoren NF- κ B aktiviert als auch Curcumin, eine Substanz, die den Transkriptionsfaktor AP-1 inhibiert, die GCDCA-vermittelte Apoptose blockieren können. Beide Substanzen sind für den Menschen nicht toxisch und werden bereits seit langem bei der Therapie von nichtcholestatische Erkrankungen angewendet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten neue Impulse für die Therapie cholestatischer Lebererkrankungen geben.

5. Zusammenfassung

Hydrophobe Gallensäuren werden für die Leberzellschädigung bei cholestatischen Lebererkrankungen verantwortlich gemacht. Sie induzieren nach Aufnahme in Hepatozyten Apoptose. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Effekte der quantitativ wichtigsten hydrophoben Gallensäure des Menschen, Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA), auf molekulare Signaltransduktionswege, die Apoptose induzieren oder hemmen, und die Modulation der Transkription von Genen, die für pro- und antiapoptotische Proteine kodieren, weiter aufzuklären. Die Untersuchungen wurden am Modell der humanen Hepatomzelllinie HepG2, die stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert wurde, durchgeführt.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt Untersuchungen zum Mechanismus der Apoptoseinduktion durch GCDCA. Die Ergebnisse deuten auf die Aktivierung eines molekularen Signaltransduktionsweges der Apoptoseauslösung durch GCDCA hin, der dem aktuellen Modell der Apoptoseinduktion durch Gallensäuren widerspricht. Bisher wird auf der Basis von Versuchen an Zelllinien und primären Hepatozyten aus Nagetieren eine Fas-Todesrezeptor-abhängige Induktion der Apoptose favorisiert. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Fas-defizienten humanen Hepatomzelllinien Hep3B und Huh7 nach Aufnahme der hydrophoben Gallensäuren GCDCA und Taurolithocholsäure TLCA effizient Apoptose induzieren. Dieser Befund stellt die zentrale Bedeutung des Fas-Rezeptors für die Gallensäuren-induzierte Apoptose infrage. Zellen der humanen Hepatomzelllinie HepG2, die stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert wurden, reagierten trotz Inhibition der Caspase-8 mittels siRNA oder Blockade der Caspase-8 mit dem spezifischen Inhibitor Z-IETD-FMK nach GCDCA-Stimulation mit Apoptoseauslösung. Ausschalten der Caspase-8 führte stets zum Verschwinden der aktiven Caspase-8, ohne die Proteolyse der Caspasen-9, -3 oder -7 zu beeinflussen. Diese Befunde zeigen, dass Gallensäuren wie GCDCA in humanen Hepatomzelllinien nicht nur Fas-, sondern auch Caspase-8-unabhängig Apoptose auslösen und am ehesten Apoptose über den mitochondrialen Weg mit Austritt von proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum und Aktivierung von Caspase-9 induzieren. Caspase-8 könnte dabei entweder zusätzlich über den extrinsischen Weg oder durch nachträgliche

Amplifizierung des apoptotischen Signals durch einen bisher noch nicht identifizierten Mediator aktiviert werden.

Der zweite Teil der Arbeit untersucht die GCDCA-vermittelte Modulation der Transkription pro- und antiapoptotischer Gene in der humanen Ntcp-transfizierten Hepatomzelllinie HepG2.

Sulfasalazin als ein bekannter Modulator von Apoptose über den Transkriptionsfaktor NF- κ B, verhinderte dosisabhängig die Gallensäuren-vermittelte Apoptoseinduktion. Sulfasalazin hemmte sowohl die Aktivierung der Caspasen-3 und -7, als auch die der Caspasen-8 und -9. In primären Maushepatozyten verhindert die gleichzeitige Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren und Sulfasalazin ebenfalls die Induktion der Apoptose. Sulfasalazin hemmte dosisabhängig die durch hydrophobe Gallensäuren hervorgerufene Generierung von reaktiven Sauerstoffintermediaten und verhinderte die Gallensäuren-unabhängige Apoptoseinduktion durch Staurosporin. NF- κ B, bestimmt mittels Reportergenassay und EMSA, wurde durch Sulfasalazin aktiviert, während die GCDCA-vermittelte Aktivierung der MAP Kinasen c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38MAPK durch Sulfasalazin verhindert wurde. Sulfasalazin scheint damit die GCDCA-vermittelte Apoptose durch Aktivierung von Überlebenswegen über NF- κ B und Inhibierung der Signaltransduktionswege über JNK und p38MAPK dosisabhängig zu blockieren.

Die Modulation der Transkription von 500 Apoptose-spezifischen Genen wurde in HepG2-Ntcp Zellen mittels cDNA-Microarray nach Stimulation mit GCDCA in An- und Abwesenheit von Sulfasalazin untersucht. Die durch GCDCA veränderte Expression von cFos, JunB, RelB und Rox konnte mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden. Die Reduzierung der Bcl-X_L mRNA durch Stimulation von HepG2-Ntcp Zellen mit GCDCA beeinflusste den endogenen Proteingehalt von Bcl-X_L nicht. Die verstärkte Transkription der AP-1-Gene cFos und JunB durch GCDCA-Stimulation war mit einer positiven Beeinflussung der AP-1 Aktivität assoziiert, wie im EMSA belegt und im Reportergenassay angedeutet wurde. Die Transfektion der HepG2-Ntcp Zellen mit den Expressionsplasmiden der AP-1 Komponenten beeinflusste die GCDCA-vermittelte Apoptoseinduktion nicht. TAM67, das dominant-negative Expressionsplasmid des AP-1 Proteins cJun, verändert die Caspase-3/-7 Aktivität

nach GCDCA-Stimulation ebenfalls nicht. AP-1 Inhibitionsversuche mit Curcumin, dem gelben Pigment aus *Curcuma longa*, der Gelbwurz, zeigten sowohl im EMSA als auch im Reporterassay eine eindeutige Reduktion der PMA-induzierten AP-1 Aktivität. Die Gallensäureaufnahme wurde durch Curcumin nicht beeinträchtigt. Die GCDCA- und TLCA-vermittelte Apoptoseinduktion wurde durch den AP-1-Inhibitor Curcumin dosisabhängig verhindert.

Die Ergebnisse des zweiten Abschnitts belegen, dass die Modulation der Transkription Apoptose-spezifischer Gene bei der Gallensäuren-vermittelten Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen eine bedeutende Rolle spielt. Gallensäuren modulieren die Aktivitäten vieler zellulärer Proteine wie JNK, p38MAPK oder AP-1. Darüber hinaus werden Proteine wie cFos, JunB, RelB oder Rox, die die zelluläre Proteinexpression steuern, durch Gallensäuren in ihrer Transkription moduliert. Sowohl Sulfasalazin, ein Aktivator von NFκB und Inhibitor von JNK und p38MAPK, als auch Curcumin, ein Inhibitor des AP-1 Transkriptionskomplexes, verhindern die durch GCDCA induzierte Apoptose in einer humanen Hepatomzelllinie. Der Einsatz von Sulfasalazin und Curcumin sollte auf positive Effekte bei der Behandlung von cholestatischen Erkrankungen in klinischen Studien überprüft werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalizylsäure
A	Adenin (Nukleinsäure)
A	Alanin (Aminosäure)
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Act D	Actinomycin D
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
Akt	Protein Serin/Threonin Kinase = PKB
ANT	<i>adenine nucleotide translocator</i>
AP-1	<i>activation protein 1</i>
Apaf	<i>apoptotic protease-activating factor</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
Bad	<i>Bcl-2 agonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 agonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X-factor</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BH-Domänen	<i>Bcl-2 homology domains</i>
Bid	<i>BH3-interacting DD agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
BIR	<i>baculovirus inhibitor repeat</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	<i>bile salt export pump</i>
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
C	Cytosin
CA	Cholsäure
Ca ²⁺	Kalzium
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
cDNA	<i>complementary DANN</i>

CDCA	Chenodeoxycholsäure
Ced	<i>Caenorhabditis elegans death</i>
c-Flip	<i>Fas associated deathdomain-like ICE-inhibitor protein</i>
CHO	Aldehyd-Gruppe
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CK2	Casein Kinase 2
COX-2	Cyclooxygenase 2
D	Asparaginsäure
dATP	Desoxy- Adenosin-5`-Triphospat
DCA	Deoxycholsäure
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triposphat
ds	doppelsträngig
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-R	<i>epidermal growth-factor receptor</i>
EMSA	<i>Electromobility shift assay</i>
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk 1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FLIP	<i>FLICE (Caspase-8)-inhibitory protein</i>
FMK	Fluoromethylketon
FXR	Farnesoid X Rezeptor
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure

GFK-3 β	Glycogen-Synthetase-Kinase 3 β
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GR	Glucocortikoidrezeptor
h	Stunde(n)
H ₂ DCFDA	Dichlorodihydrofluoreszin Diacetat
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
H-FABP	<i>heart fatty acid binding protein</i>
I	Isoleucin
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
I-BABP	<i>intestinal bile acid-binding protein</i>
ICAD	<i>inhibitor of CAD</i>
ICE	<i>interleukin 1β converting enzyme</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5,-Triphosphat
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LCA	Lithocholsäure
LOX	Lipooxygenase
M	Mol
m	Milli-
MAF	musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
Mdr	<i>multidrug resistance protein</i>
MEF2C	<i>myocyte-enhancer factor 2C</i>
Min	Minute(n)
MKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mrp	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
MW	Mittelwert
μ	Mikro-
n	Nano-
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>

NIK	<i>NF-kappa B inducing kinase</i>
NSAID	nicht-steroidale antiinflammatorische Substanzen
nt	Nukleotid
Ntcp	<i>Na-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
Oatp	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK-1	<i>phosphatidylinositol-dependent kinase 1</i>
PI ₃ K	Phosphatidylinositol-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PIQOR	<i>Parallel Identification and Quantification of RNAs</i>
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PNK	Polynucleotidkinase
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PT-Pore	<i>permeability transition pore</i>
RAR	Retinolsäure-Rezeptor
RIP	<i>receptor interaction protein</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RKO	colorectal carcinoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rRNA	ribosomale RNA
RSK2	ribosomale S6 Kinase 2
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time PCR</i>
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfat</i>

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHE	Syrian hamster embryo
SPD	Sulfapyridin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smac	<i>second mitochondrial activator of caspases</i>
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
SSZ	Sulfasalazin
STSP	Staurosporin
tBid	<i>truncated Bid</i>
T	Thymin (Nukleinsäure) oder Threonin (Aminosäure)
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TCF	<i>ternary complex factors</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	Thymidinkinase
TLCA	Taurolithocholsäure
TLCS	Taurolithocholat-3-Sulphat
TM	Transmembran-Domäne
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNF-R	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TRADD	<i>TNF receptor associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
U	Units/Einheiten oder Uracil-Base
UDCA	Ursodeoxycholsäure
V	Valin
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
WT	Wildtyp
XIAP	<i>X-chromosome linked IAP</i>
Z	Benzyloxycarbonyl
Zn	Zink

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Mechanismen der Caspasenaktivierung..	15
Abbildung 2: Das Apoptosom	16
Abbildung 3: Liste der Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie	19
Abbildung 4: Überblick über die wichtigsten Signalwege der Apoptose in Säugerzellen.	24
Abbildung 5: Biosynthese der Gallensäuren	29
Abbildung 6: Hepatobiliäre Transportmechanismen.....	31
Abbildung 7: Modell des Einflusses der Gallensäuren auf die Leberzelle.	38
Abbildung 8: Sulfasalazin (SSZ).	40
Abbildung 9: Strukturformel von Curcumin	41
Abbildung 10: GCDCA induziert Apoptose nach Aufnahme in Hepatozyten	82
Abbildung 11: Hydrophobe Gallensäuren induzieren Apoptose	83
Abbildung 12: GCDCA aktiviert Caspase-3, -7, -8 und -9	84
Abbildung 13: Hep3B und Huh7 Zellen synthetisieren keine Fas-Rezeptor mRNA.....	85
Abbildung 14: Hep3B und Huh7 Zellen exprimieren keinen Fas-Rezeptor.....	85
Abbildung 15: [³ H]-TCA Aufnahme der stabilen Hep3B-Ntcp Klone.....	86
Abbildung 16: [³ H]-TCA Aufnahme der stabilen Huh7-Ntcp Klone.	87
Abbildung 17: Hydrophobe Gallensäuren induzieren Apoptose nach Aufnahme in Hep3B- Ntcp Zellen	87
Abbildung 18: GCDCA induziert Apoptose nach Aufnahme in Huh7 Zellen	88
Abbildung 19: cDNA-Sequenz von Caspase-8	90
Abbildung 20: pSUPER gegen Caspase-8 zeigt keine Reduktion des Proteingehaltes.....	91
Abbildung 21: pSUPER gegen Caspase-8 zeigt keine eindeutige Reduktion der Expression in Hela und Cos Zellen.....	92
Abbildung 22: Keine Reduktion des Caspase-8 Proteingehaltes in den stabilen pSUPER- Caspase-8-Puromycin Klonen	93
Abbildung 23: Proteingehalt von Caspase-8 in weiteren stabilen pSUPER-Caspase-8- Puromycin Klonen.....	93
Abbildung 24: Transiente Transfektion mit 10nM und 50nM siRNA gegen Caspase-8 reduzieren den Proteingehalt effizient.....	94
Abbildung 25: Zeitkinetik einer Transfektion mit 10nM siRNA gegen Caspase-8	95
Abbildung 26: Knockout der Caspase-8 in HepG2-Ntcp Zellen verhindert die GCDCA- induzierte Apoptose nicht.....	96

Abbildung 27: Caspase-3/7 Aktivität nach Apoptoseinduktion in Caspase-8-defizienten HepG2-Ntcp Zellen.....	97
Abbildung 28: Z-IETD-FMK (20 - 100 µM) inhibiert Caspase-8.....	98
Abbildung 29: Niedrige Konzentrationen Z-IETD-FMK inhibieren Caspase-8 nicht.....	99
Abbildung 30: Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-induzierte Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen dosisabhängig	100
Abbildung 31: Immunocytologie mit cleaved Caspase-3 Antikörper zeigt Inhibierung der Apoptose durch Sulfasalazin.	101
Abbildung 32: Auszählung der Immunocytologie gegen cleaved Caspase-3	102
Abbildung 33: Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-vermittelte Apoptose in primären Maushepatozyten dosisabhängig.....	103
Abbildung 34: Sulfasalazin reduziert die Caspase-8 Aktivität.....	104
Abbildung 35: Sulfasalazin inhibiert die Caspase-9 Aktivierung.....	104
Abbildung 36: Sulfapyridin hat keinen Einfluss auf die GCDCA-induzierte Apoptose.....	107
Abbildung 37: 5-Aminosalicylsäure zeigt keine Reduktion der GCDCA-vermittelten Apoptose	108
Abbildung 38: SSZ inhibiert Gallensäuren-unabhängige Apoptose.....	109
Abbildung 39: Sulfasalazin aktiviert NF-κB dosisabhängig im Reporterassay	110
Abbildung 40: Sulfasalazin aktiviert NF-κB im EMSA.....	110
Abbildung 41: Sulfasalazin reduziert die GCDCA-induzierte Aktivierung von JNK.....	111
Abbildung 42: Sulfasalazin reduziert die GCDCA-vermittelte Aktivierung der p38-MAPK. ...	112
Abbildung 43: Sulfasalazin hat keinen Effekt auf die Aktivierung von Erk 1/2.	112
Abbildung 44: Arbeitsschema zur Durchführung eines Microarrays.....	114
Abbildung 45: Qualität und Quantität der Gesamt-RNA.....	115
Abbildung 46: Übereinandergelegte Scans der Microarrays nach Cy3 und Cy5 Fluoreszenzsignalen.....	116
Abbildung 47: Scatterplot der Signalintensitäten.....	117
Abbildung 48: Quantitative PCR zur Ermittlung der Standardkurven	126
Abbildung 49: Standardkurven und Regressionsgleichungen der Zielgene und GAPDH....	129
Abbildung 50: Quantitative PCR.....	130
Abbildung 51: Agarosegelelectrophorese nach quantitativer RT-PCR.....	131
Abbildung 52: Quantifizierung von cFos	134
Abbildung 53: Quantifizierung von JunB.....	134
Abbildung 54: Quantifizierung von RelB	135
Abbildung 55: Quantifizierung von Rox.....	136
Abbildung 56: Quantifizierung von Bcl-X _L	136
Abbildung 57: Analyse des Bcl-X _L Proteingehalts nach 4h - 41h Stimulation mit GCDCA...	138

Abbildung 58: Einfluss von GCDCA und TUDCA auf den Bcl-X _L Proteingehalt	139
Abbildung 59: GCDCA zeigt Aktivierung von AP-1 im EMSAt.....	141
Abbildung 60: GCDCA aktiviert AP-1 im Reporteragenassay	142
Abbildung 61: Transfektion mit cFos-, JunB- und cJun-Plasmiden induziert deren Expression	143
Abbildung 62: AP-1 Komponenten modulieren die AP-1 Aktivität im Reporteragen-Assay ...	144
Abbildung 63: AP-1 Komponenten verändern GCDCA-induzierte Apoptoserate nicht	145
Abbildung 64: Curcumin inhibiert AP-1 im EMSA.	146
Abbildung 65: Curcumin inhibiert die Aktivität von AP-1 im Reporteragenassay	147
Abbildung 66: Curcumin inhibiert die GCDCA- und TLCA-vermittelte Apoptose	148
Abbildung 67: Curcumin beeinflusst die Gallensäureaufnahme nicht.....	149
Abbildung 68: Zusammenfassung der molekularen Mechanismen der Gallensäuren- vermittelten Apoptose	152
Abbildung 69: Gallensäuren lösen unabhängig von Fas-Rezeptor Apoptose aus	156
Abbildung 70: GCDCA induziert Apoptose unabhängig von Caspase-8 in HepG2-Ntcp Zellen.....	160
Abbildung 71: Modell der GCDCA-vermittelten Apoptoseinduktion.....	161
Abbildung 72: Hypothetisches Modell des cytoprotektiven Einflusses von Sulfasalazin bei der GCDCA-induzierten Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen.	166
Abbildung 73: Transkriptionelle und post-translational Aktivierung von AP-1.....	173

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Plasmide	46
Tabelle 2: Oligonukleotide	47
Tabelle 3: Antikörper	55
Tabelle 4: Pipetierschema für die Standardkurven	64
Tabelle 5: DNA-Transfektion mittels Fugene	71
Tabelle 6: Sulfasalazin inhibiert die GCDCA-vermittelte ROS-Bildung.....	105
Tabelle 7: Sulfasalazin verhindert die TLCA-induzierte Generierung von ROS.....	106
Tabelle 8: Auflistung der Gene mit modulierter Transkription.....	122

8. Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Cory S. **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** *Science* 1998,281:1322-1326.
 2. Alnemri E, Livingston SDJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. **Human ICE/CED-3 protease nomenclature.** *Cell* 1996,87:171-175.
 3. Altucci LGH. **The promise of retinoids to fight against cancer.** *Nature Rev Cancer* 2001,1:181-193.
 4. Ambrosi G, Adida C, Altieri D. **A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.** *Nat Med* 1997,3:917-921.
 5. Ammon HP. **Pharmacology of Curcuma longa.** *Planta Med* 1991,57:1-7.
 6. Anto RJMA, Denning K, Aggarwal BB. **Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-XL.** *Carcinogenesis* 2002,23:143-150.
 7. Antonsson B. **Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 "killer-proteins" and their victim, the mitochondrion.** *Cell Tissue Res* 2001,306:347-361.
 8. Antwerp DJV, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. **Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF κ B.** *Science* 1996,274:787-789.
 9. Aruoma OL, Wasil M, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. **The scavenging of oxidants by sulfasalazine and its metabolites. A possible contribution to their anti-inflammatory effects?** *Biochem Pharmacol* 1987,36:3739-3742
-

-
10. Ashkenazi ADVM. **Apoptosis control by death and decoy receptors.** *Curr Opin Cell Biol* 1999,11:255-260.
 11. Baichwal VR, Baeuerle PA. **Activate NF-kappa B or die?** *Current Biology* 1997,7:R94-96.
 12. Beraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA. **Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999,96:429-434.
 13. Beuers U, Denk GU, Soroka CJ, Wimmer R, Rust C, Paumgartner G, Boyer JL. **Taurolithocholic acid exerts cholestatic effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets.** *J Biol Chem* 2003,278(20):17810-17818.
 14. Beuers U, Soroka C, Denk GU, *et al.* **Taurolithocholic acid impairs hepatocellular bile acid and organic anion secretion by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism.** *Hepatology* 2001,34.f
 15. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, *et al.* **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* 2001,33:1206-1216.
 16. Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G. **Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications.** *Hepatology* 1998,28:1449-1453.
 17. Beuers U, Nathanson MH, Isales CM, Boyer JL. **Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca⁺⁺ mechanisms defective in cholestasis.** *J Clin Invest* 1993,92:2984-2993.
-

-
18. Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS, *et al.* **Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes.** *Gastroenterology* 1996,110:1553-1563.
 19. Biosystems A. **User Bulletin #2; ABI Prism 7700 Sequence Detection System.** 2001.
 20. Birnbaum MJCRJ, Miller LK. **An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs.** *J. Virol.* 1994,68:2521-2528.
 21. Bode WHR. **Proteinase-protein inhibitor interaction.** *Biomed Biochim Acta* 1991,50:437-446.
 22. 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* 1997,112:214-225.
 23. Bouillet PMD, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A. **Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity.** *Science* 1999,286:1735-1738.
 24. Brummelkamp TBR, Agami R. **A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells.** *Science* 2002,296:550-553.
 25. Callejas NA, Casado M, Bosca L, Martin-Sanz P. **Absence of nuclear factor kappaB inhibition by NSAIDs in hepatocytes.** *Hepatology* 2002,35(2):341-348.
 26. Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, Bronk SF, Gores GJ. **The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004,308:1191-1196.
-

-
27. Cantley LC. **The phosphoinositide 3-kinase pathway.** *Science* 2002,296:1655-1657.
 28. Cardone MH, Roy M, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, *et al.* **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998,282:1318-1321.
 29. Chai JDC, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. **Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000,406:855-862.
 30. Chan WHWHJ, Hsuuw YD. **Curcumin Inhibits ROS Formation and Apoptosis in Methylglyoxal-Treated Human Hepatoma G2 Cells.** *Ann N Y Acad Sci* 2005,1042:372-378.
 31. Chen HZZS, Zhang YL. **Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells.** *Anticancer Res* 1999,19:3675-3680.
 32. Chen YRTTH. **Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin.** *Oncogene* 1998,17:173-178.
 33. Cheng ALHCH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, *et al.* **Phase I clinical trial of curcumin, a chemoprotective agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions.** *Anticancer Res* 2001,21:2895-2900.
 34. Cikala M, Wim B, Hobmayer E, Bottger A, David C. **Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra.** *Curr Biol* 1999,9:959-962.
 35. Clem RJMLK. **Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and IAP.** *Mol Cell Bio.* 1994,14:5212-5222.
 36. Crook NECRJ, Miller LK. **An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif.** *J Virol* 1993,67:2168-2174.
-

-
37. Czaja MJ. **The future of GI and liver research: editorial perspectives. III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003,284:G875-879.
 38. Das KM, Chowdhury JR, Zapp B, Fara JW. **Small bowel absorption of sulfasalazine and its hepatic metabolism in human beings, cats and rats.** *Gastroenterology* 1979,77:280-284.
 39. Das KM, Eastwood MA, McManus JPA, Sircus W. **The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis.** *Gut* 1973,14:631-641.
 40. Datta S, Dudek H, Tao X, *et al.* **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** *Cell* 1997,91:231-241.
 41. De Jong D, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB, Kluin PM. **Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells.** *Cancer Research* 1994,54:256-260.
 42. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. **X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.** *Nature* 1997,388:300-304.
 43. Di Toro RCG, Murari G, Spampinato S. **Effects of specific bile acids on c-fos messenger RNA levels in human colon carcinoma Caco-2 cells.** *Eur J Pharm Sci* 2000,11:291-298.
 44. Dickinson DAIKE, Zhang H, Blank V, Forman HJ. **Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression.** *Fed Am Soc Exp Biol J* 2003,17:473-475.
 45. Donovan NBEB, Konish Y, Bonni A. **JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery.** *J Biol Chem* 2002,277:40944 - 40949.
-

-
46. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.** *Cell* 2000,102:33-42.
 47. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. **A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors.** *EMBO J* 1996,15:2685-2689.
 48. Duvoix ABR, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henty E, Dicato M, Diederich M. **Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin.** *Cancer Letters* 2005,223:181-190.
 49. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufman SH. **Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.** *Annu Rev Biochem* 1999,68:383-424.
 50. Eferl R, Wagner EF. **AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.** *Nat Rev Cancer* 2003,3:859-868.
 51. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. **A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.** *Nature* 1998,391:43-50.
 52. Faubion W, Guicciardi M, Miyoshi H, *et al.* **Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas.** *J Clin Invest* 1999,103:137-145.
 53. Feng G, Kaplowitz N. **Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002,282:G825-834.
-

-
54. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, *et al.* **Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver.** *Gastroenterology* 2001,121:170-183.
 55. Fire AXS, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998,391:806-811.
 56. Fischer C, Klotz U. **High-performance liquid chromatographic determination of aminosalicylate, sulfapyridine and their metabolites - its application for pharmacokinetic studies with salicylazosulfapyridine in man.** *Journal of Chromatography* 1979,162:237-243.
 57. Franke T, Kaplan D, Cantley L. **PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis.** *Cell* 1997,88:435-437.
 58. Gagginella TS, Walsh RE. **Sulfasalazine: multiplicity of action.** *Digestive Diseases and Sciences* 1992,37:801-812.
 59. Garcea GJDJL, Singh R, Dennion AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ, Berry DP. **Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration.** *Br J Cancer* 2004,90:1011-1015.
 60. Garcia-Calvo MPEP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW, Thornberry NA. **Purification and catalytic properties of human caspase family members.** *Cell Death and Differentiation* 1999,6:362-369.
 61. Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, *et al.* **Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis.** *Gastroenterology* 1996,110:199-209.
 62. Gerok B. **Hepatologie.** *Urban & Schwarzenberg* 1995, 2.Auflage.
-

-
63. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. **NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses.** *Annual Review of Immunology* 1998,16:225-260.
64. Giuliano MBG, Lauricella M, D'Anneo A, Vassallo B, Vento R, Tesoriere G. **Staurosporine-induced apoptosis in Chang liver cells is associated with down-regulation of Bcl-2 and Bcl-XI.** *Int J Mol Med* 2004,13:565-571.
65. Glasgow JN, Qiu J, Rassin D, Grafe M, Wood T, Perez-Pol JR. **Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain.** *Neurochem Res* 2001,26:647-659.
66. Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Haussinger D. **Taurolithocolic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in an c-Jun N-terminal kinase-dependent manner.** *Gastroenterology* 2002,122:1411-1427.
67. Green D, Kroemer G. **The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?** *Trends in Cell Biology* 1998,8:267-271.
68. Green RM, Beier D, Gollan JL. **Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents.** *Gastroenterology* 1996,111:193-198.
69. Griffiths GJDL, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. **Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis.** *J Cell Biol* 1999,144:903-914.
70. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. **Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis.** *Genes & Dev* 1999,13:1899-1911.
71. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. **Caspase cleaved BID targets mitochondria**
-

-
- and is required for cytochrome c release, while Bcl-XL prevents this release but not tumour necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999,274:1156-1163.
72. Guicciardi MEGGJ. **Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed.** *J Hepatol* 2005,42:297-300.
73. Hagey LRCDL, Espinosa E, Carey MC, Igimi H, Hofamnn AF. **Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and relate carnivores.** *J Lipid Res* 1993,34:1911-1917.
74. Heiden MG, Thompson CB. **Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?** *Nature Cell Biol* 1999,1:E209-216.
75. Heiden VMGCNS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. **Bcl-XL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria.** *Cell* 1997,91:627-637.
76. Hengartner MO. **The biochemistry of apoptosis.** *Nature* 2000,407:770-776.
77. Hermisson M, Weller M. **NF-kappaB-independent actions of sulfasalazine dissociate the CD95L- and Apo2L/TRAIL-dependent death signaling pathways in human malignant glioma cells.** *Cell Death Differ* 2003,10:1078-1089.
78. Herrlich P. **Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1.** *Oncogene* 2001,20:2465-2475.
79. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, et al. **The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis.** *J Biol Chem* 2001,276:38610-38618.
-

-
80. Higuchi H, Miyoshi H, Bronk SF, Zhang H, Dean N, Gores GJ. **Bid antisense attenuates bile acid-induced apoptosis and cholestatic liver injury.** *J Pharmacol Exp Ther* 2001,299:866-873.
 81. Higuchi H, Yoon JH, Grambihler A, Werneburg N, Bronk SF, Gores GJ. **Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis.** *J Biol Chem* 2003,278:454-461.
 82. Higuchi H. **Bile Acid Regulation of Hepatic Physiology IV. Bile acids and death receptors.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003,284:G734-G738.
 83. Hirano FTH, Makino Y, Okamoto K, Hiramoto M, Handa H, Makino I. **Induction of the transcription factor AP-1 in cultured human colon adenocarcinoma cells following exposure to bile acids.** *Carcinogenesis* 1996,17:427-433.
 84. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. **Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.** *Nature* 1990,348:334-336.
 85. Hoult JR. **Pharmacological and biochemical actions of sulphasalazine.** *Drugs* 1986,32:18-26.
 86. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. **Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci* 1997,94:3668-3672.
 87. Huang MTLT, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. **Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis.** *Cancer Res* 1991,51:813-819.
 88. Huang MTNHL, Frenkel K. **Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice.** *J Cell Biochem Suppl* 1997,27:26-43.
-

-
89. Huang TSLSC, Lin JK. **Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1991,88:5292-5296.
 90. Javitt J. **Cholestasis in rats induced by tauroolithocholate.** *Nature* 1966,210:1262-1263.
 91. Jiang MCYYHFJ, Yen JJ, Lin JK. **Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines.** *Nutr Cancer* 1996,26:111-120.
 92. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. **Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death.** *Nature* 2001,410:549-554.
 93. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. **Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade.** *J Curr Biol* 1998,8:1001-1008.
 94. Kaminska BPB, Ciechomska I, Wisniewska M. **Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity.** *Acta Neurobiol.* 2000,60:395-402.
 95. Kanda HMM. **Regulatory roles of JNK in programmed cell death.** *J Biochem* 2004,136:1-6.
 96. Karsan AYE, Harlan JM. **Endothelial Cell Death Induced by Tumor Necrosis Factor- α Is Inhibited by the Bcl-2 Family Member, A1.** *J Biol Chem* 1996,271:27201-27204.
-

-
97. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *British Journal of Cancer* 1972,26:239-257.
 98. Khan AKA, Truelove SC, Aronson JK. **The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man.** *British Journal of Clinical Pharmacology* 1982,13:528-532.
 99. Kim AH, Khursigara GJ, Hundal HS. **Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1.** *Molecular and Cellular Biology* 2001,21:893-901.
 100. 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 - G417.
 101. Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, *et al.* **Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis.** *Hepatology* 1997,25:1077-1084.
 102. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. **Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localize to the basolateral hepatocyte membrane.** *Hepatology* 1999,29:1156-1163.
 103. Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. **Toxicity of bile acid on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria.** *Hepatology* 1994,19:471-479.
 104. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. **Mitochondrial control of apoptosis.** *Immunol Today* 1997,18:44-51.
 105. Kroemer G. **Mitochondrial control of cell death.** *Nature Medicine* 2000,6:513-519.
-

-
106. Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. **Hepatobiliary transport.** *Journal of Hepatology* 2000,32:3-18.
107. Kuo MLHTS, Lin JK. **Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promotor, induces apoptosis in human leukemia cells.** *Biochem Biophys Acta* 1996,1317:95-100.
108. Kurosawa H, Que FG, Roberts LR, Fesmier PJ, Gores GJ. **Hepatocytes in the bile duct-ligated rat express Bcl-2.** *American Journal of Physiology* 1997,272:G1587-1593.
109. Kurz AK, Graf D, Schmitt M, Vom DS, Häussinger D. **Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats.** *Gastroenterology* 2001,121:407-419.
110. Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970,227:680-685.
111. Lamboley CBAF, Camus E, Lardeux B, Groyer A, Feldmann G. **Overexpression of the mouse Fas gene in human Hep3B hepatoma cells overcomes their resistance to Fas-mediated apoptosis.** *J Hepatol* 2002,36:385-394.
112. Lampe VMJ. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1913,46:2235.
113. Lawlor MA, Alessi DR. **PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin response?** *J Cell Sci* 2001,114:2903-2910.
114. Li JKJM, Liston P, Miyazaki T, Mackenzie AE, Korneluk RG, Tsang BK. **Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia.** *Endocrinology* 1998,139:1321-1328.
-

-
115. Li LY, Luo X, Wang X. **Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic DNase when released from mitochondria.** *Nature* 2001,412:95-99.
116. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* **Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.** *Cell* 1997,91:479-489.
117. Lin JK. **Suppression of Protein Kinase C and Nuclear Oncogene Expression as Possible Action Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Curcumin.** *Arch Pharm Res* 2004,27:683-692.
118. Liptay S, Bachem M, Hacker G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM. **Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine.** *Br J Pharmacol* 1999,128:1361-1369.
119. Liptay S, Fulda S, Schanbacher M, *et al.* **Molecular mechanisms of sulfasalazine-induced T-cell apoptosis.** *Br J Pharmacol* 2002,137:608-620.
120. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda J, MacKenzie A, Korneluk RG. **Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes.** *Nature* 1996,379:349-353.
121. Liu H, Lo CR, Czaja MJ. **NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through sustained activation of JNK and c-Jun.** *Hepatology* 2002,35:772-778.
122. Liu ZSC, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. **Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain.** *Nature* 2000,408:1004-1008.
123. Lloyd AYN, Wasylyk B. **Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain.** *Nature* 1991,352:635-638.
-

-
124. Lu YPCRL, Lou YR, Huang MT, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. **Effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis.** *Carcinogenesis* 1994,15:2363-2370.
125. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, *et al.* **Identification of a nuclear receptor for bile acids.** *Science* 1999,284:1362-1365.
126. Manning FC, Patierno SR. **Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis?** *Cancer Investigation* 1996,14:455-465.
127. Mechta FLD, Pfarr CM. **Transformation of ras modifies AP1 composition and activity.** *Oncogene* 1997,14:837-847.
128. Mechta-Grigoriou FGD, Yaniv M. **The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity.** *Oncogene* 2001,20:2378-2389.
129. Meergans THAK, Horak D, Haenisch C, Webdel A. **The short prodomain influences caspase-3 activation in HeLa cells.** *Biochem J* 2000,349:135-140.
130. Meier PFA, Evan G. **Apoptosis in development.** *Nature* 2000,407:796-801.
131. Menon LGKR, Kuttan G. **Anti-metastatic activity of curcumin and catechin.** *Cancer Letters* 1999,141:159-165.
132. Milligan CESL. **Programmed cell death during animal development.** *Br Med Bull* 1997,53:570-590.
133. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. **NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *J Biol Chem* 2000,276:16391-16398.
-

-
134. 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 USA* 1999,96(10):5814-5819.
 135. Mitry RR, Sarraf CE, Wu CG, Pignatelli M, Habib NA. **Wild-type p53 induces apoptosis in Hep3B through up-regulation of bax expression.** *Laboratory Investigation* 1997,77:369-378.
 136. Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y. **Effect of sulphasalazine and its metabolites on the generation of reactive oxygen species.** *Gut* 1987,28:190-195.
 137. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. **Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas.** *Gastroenterology* 1999,117(3):669-677.
 138. Muchmore SWSM, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. **X-ray and NMR structure of human Bcl-XL, an inhibitor of programmed cell death.** *Nature* 1996,381:335-341.
 139. Mühlhardt C. **Der Experimentator: Molekularbiologie.** Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2000, 2. Auflage.
 140. Muzio M, Stickwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. **An induced proximity model for caspase-8 activation.** *J Biol Chem* 1998,273:2926-2930.
 141. Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K. **Differential regulation of I κ B kinase α and β by two upstream kinases, NF- κ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998,95:3537-3542.
-

-
142. Napoli CLC, Jorgensen RA. **Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans plant.** *Cell* 1990,2:279-289.
143. Nguyen M, Millar CL, Yong VW, Korsmeyer SJ. **Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence.** *J Biol Chem* 1993,268:25265-25268.
144. Nicolson DW. **Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.** *Cell Death Differ* 1999,6:1028-1042.
145. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. **Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.** *Cell* 1993,74:609-619.
146. Ono F, Nakagawa T, Saito S, Owada Y, Sakagami H, Goto K, Suzuki M, Matsuno S, Kondo H. **A novel class II phosphoinositide 3-kinase predominantly expressed in the liver and its enhanced expression during liver regeneration.** *J Biol Chem* 1998,273(13):7731-7736.
147. Oswald M, Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. **Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) in primary biliary cirrhosis.** *Hepatology* 1998,28:544A.
148. Pan MHHTM, Lin JK. **Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronization in mice.** *Drug Metab Dispos* 1999,27:486-494.
149. Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW. **Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-Flip expression in tumor cells.** *J Biol Chem* 2001,276:6893-6896.
150. Passegue EWEF. **JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16INK4A expression.** *Embo J* 2000,19:2969-2979.
-

-
151. Peppercorn MA, Goldmann P. **Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites.** *Gastroenterology* 1973,64:240-245.
 152. Preston GALTT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC. **Induction of Apoptosis by c-Fos Protein.** *Mol Cell Biol* 1996,16:211-218.
 153. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. **The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex.** *Mol Cell* 1999,3:287-296.
 154. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A. **Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis.** *Science* 2001,293:1829-1832.
 155. Pyrzynska BMG, Kaminska B. **Changes of the trans-activating potential of AP-1 transcription factor during cyclosporin A-induced apoptosis of glioma cells are mediated by phosphorylation and alterations of AP-1 composition.** *J Neurochem* 2000,74:42-51.
 156. Qiao L, Yacoub A, Studer E, *et al.* **Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes.** *Hepatology* 2002,35:779-789.
 157. Qiao LSE, Leach K, Mckinstry R, Gupta S, Decker R, Kukreja R, Valerie K, Nagarkatti P, Deiry WE, Molkentin J, Schmidt-Ullrich R, Fisher PB, Grant S, Hylemon PB, Dent P. **Deoxycholic Acid (DCA) Causes Ligand-independent activation of Epidermal Growth Factor receptor (EGFR) and Fas Receptor in Primary Hepatocytes: Inhibition of EGFR/Mitogen-activated Protein Kinase-Signaling Module Enhances DCA-induced Apoptosis.** *Molecular Biology of the Cell* 2001,12:2629-2645.
-

-
158. Qiao LSED, Martinez JD. **Activation and role of mitogen-activated protein kinases in deoxycholic acid-induced apoptosis.** *Carcinogenesis* 2001,22:35-41.
159. Qiao L, Yacoub A, Studer E, *et al.* **Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes.** *Hepatology* 2002,35:779-789.
160. Ramachandran CYW. **Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin.** *Breast Cancer Res Treat* 1999,54:269-278.
161. Rao LPD, White E. **Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis.** *J Cell Biol* 1996,135:1441-1455.
162. Reed JC. **Double- identity for proteins of the Bcl-2 family.** *Nature* 1997,387:773-776.
163. Reed JC. **Bcl-2 family proteins.** *Oncogene* 1998,17:3225-3236.
164. Reinehr R, Graf D, Häussinger D. **Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation.** *Gastroenterology* 2003,125:839-853.
165. Reinehr R, Häussinger D. **Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95.** *Gastroenterology* 2004,126:249-262.
166. Rich TARKL, Wyllie AH. **Defying death after DNA damage.** *Nature* 2000,407:777-783.
167. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. **Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating**
-

-
- mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production.** *Mol Med* 1998,4:165-178.
168. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. **Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation.** *Cell Death Differ* 1999,6:842-854.
169. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. **The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.** *EMBO J* 1997,16:6914-6925.
170. Rust C, Bauchmueller 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.
171. Rust C, Gores GJ. **Apoptosis and liver disease.** *Am J Med* 2000,108:567-574.
172. 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* 2000,275:20210-20216.
173. Sakahira H, Enari M, Nagata S. **Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.** *Nature* 1998,391:96-99.
174. Salvesen GSDVM. **Caspase activation: the induced-proximity model.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999,96:10964-10967.
175. Sanger FNS, Coulson AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1977,74:5463-5467.
-

-
176. Scaffidi CKS, Krammer PH, Peter ME. **Apoptosis signaling in lymphocytes.** *Curr Op Imm* 1999,11:277-285.
177. Scaffidi CSI, Krammer PH, Peter ME,. **The role of c-Flip in modulation of CD95-induced apoptosis.** *J Biol Chem* 1999,274:1541-1548.
178. Schendel SLXZ, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. **Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997,94:5113-5118.
179. Schlesinger PHGA, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. **Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic Bcl-2.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997,94:11357-11362.
180. Schliess F, Kurz AK, vom Dahl S, Häussinger D. **Mitogenactivated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver.** *Gastroenterology* 1997,113:1306-1314.
181. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. **Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events.** *Hepatology* 1990,12:1216-1221.
182. Schoemaker MH, Gommans WM, de la Rosa LC, *et al.* **Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation.** *J Hepatol* 2003,39:153-161.
183. Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Homan M, Klok P, Trautwein C, van Goor H, Poestral K, Haisma HJ, Jansen PLM, Moshage H. **What Doesn't Kill You Makes You Stronger: How Hepatocytes Survive Prolonged Cholestasis.** *Hepatology* 2004,39:1141-1143.
184. Schoemaker MH, Ros JE, Homan M, *et al.* **Cytokine regulation of pro- and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF-kappaB-regulated inhibitor of**
-

-
- apoptosis protein 2 (cIAP2) prevents apoptosis.** *J Hepatol* 2002,36:742-750.
185. Schroder H, Lewkonia RM, Evans DAP. **Metabolism of salizylazosulfapyridine in healthy subjects and in patients with ulcerative colitis.** *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1973,14:802-809.
186. Schroder H, Campbell DE. **Absorption, metabolism, and excretion of salicylazosulfapyridine in man.** *Clin Pharmacol Ther* 1972,13:539-551.
187. Schubert KMDV. **Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis.** *Biochem J* 2001,356:473-480.
188. Shaulian E, Karin M. **AP-1 as a regulator of cell life and death.** *Nat Cell Biol* 2002,4:E131-136.
189. Shi Y. **Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.** *Mol. Cell* 2002,9:456-470.
190. Shimizu SNM, Tsujimoto Y. **Bcl-2 proteins regulate the release of apoptotic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.** *Nature* 1999,399:483-487.
191. 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:G992-999.
192. Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumprich E, Elkins N, Everson G. **Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids.** *Pediatric Research* 2001,49:519-531.
-

-
193. Sokol RJ, Winkelhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM. **Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids.** *Gastroenterology* 1995,109:1249-1256.
 194. Sola SBMA, Brites D, Moura JJG, Rodrigues CMP. **Membrane structural changes support the involvement of mitochondria in the bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes.** *Clinical Science* 2002,103:475-485.
 195. Squires MSHEA, Hwells L, Sale S, Houghton CE, Jones JL. **Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells.** *Biochem Pharmacol* 2003,65:361-376.
 196. Srinivasula SMHR, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. **A conserved XIAP-interaction motive in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis.** *Nature* 2001,410:112-116.
 197. Stennicke HRJJM, Shi H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby M, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. **Pro-caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8.** *J Biol Chem* 1998,273:27084-27090.
 198. Strasser A, O`Connor L, Dixit VM. **Apoptosis signaling.** *Annu Rev Biochem* 2000,69:217-245.
 199. Subramanian MS, Rao MN, Devasagayam TP, Singh BB. **Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants.** *Mutat Res* 1994,311:155-249.
 200. Sulston J, Du Z, Thomas K, Wilson R, Hillier L, Staden R, Halloran N, Green P, Thierry-Mieg J, Qiu L, *et al.* **The C. elegans genome sequencing project: a beginning.** *Nature* 1992,356:37-41.
-

-
201. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M *et al.* **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *Nature* 1999,397:441-446.
202. Suzuki TMM, Onai N, Fukuda E, Hashimoto Y, Sonobe MH, Kameda T, Ichinose M, Miki K, Iba H. **Analysis of AP-1 function in cellular transformation pathways.** *J Virol* 1994,68:3527-3535.
203. Svartz N. **Ett nytt sulfonamidpreparat. Forelopande meddelande.** *Nord Med* 1941,9:544-.
204. Takahashi RDRQ, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen G, Reed J. **A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.** *J Biol Chem.* 1998,273:7787-7790.
205. Takikawa Y, Miyoshi H, Rust C, *et al.* **The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits fas apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes.** *Gastroenterology* 2001,120(7):1810-1817.
206. Tautz DRM. **An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels.** *Anal Biochem* 1983,132:14-19.
207. Thornberry NA, Lazebnik Y. **Caspases: enemies within.** *Science* 1998,281:1312-1316.
208. Tiranti V, Rossi E, Ruiz-Carrillo A, Rossi G, Rocchi M, DiDonato S, Zuffardi O, Zeviani M. **Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis.** *Genomics* 1995,25:559-564.
209. Toker A, Cantley LC. **Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase.** *Nature* 1997,387:673-676.
-

-
210. Toledo A, Yamaguchi J, Wang JY, Bass BL, Turner DJ, Strauch ED. **Taurodeoxycholate stimulates intestinal cell proliferation and protects against apoptotic cell death through activation of NF-kappaB.** *Dig Dis Sci* 2004,49:1664-1671.
211. Tomar RSMH, Chaudhary PM. **Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA.** *Oncogene* 2003,22:5712-5715.
212. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, *et al.* **The rat canalicular conjugate export pump (mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis.** *Gastroenterology* 1997,113:255-264.
213. Trauner M, Boyer JL. **Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function and Regulation.** *Physiol Rev* 2003,83:633- 671.
214. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. **Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB.** *Science* 1996,274:787-789.
215. Van Dam HCM. **Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis.** *Oncogene* 2001,20:2453-2464.
216. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke RJ, Vaux DL. **Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.** *Cell* 2000,102:43-53.
217. Virchow R. **Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische Gewebelehre.** Berlin: Hirschwald; 1871, 4. Auflage.
218. Vogel P. *J Pharm* 1815,2:50.
219. Vrenken TE, Buist-Homan M, Moshage H. **Caspase-6 is involved in bile acid induced hepatocyte apoptosis.** *Hepatology, Official Journal of the American Association for the Study of Liver Diseases* 2004,40 Suppl.1:Abstract #930.
-

-
220. Wachs FPKRC, Rodrigues C, Messmann H, Kullmann F, Knüchel-Clarke R, Schölmerich J, Rogler G, Schlottmann K. **Bile salt-induced apoptosis in human colon cancer cell lines involves the mitochondrial transmembrane potential but not the CD95 (Fas/Apo-1) receptor.** *Int J Colorectal Dis* 2005,20:103-113.
221. Wada TPJM. **Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation.** *Oncogene* 2004,23:2838-2849.
222. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid R. **Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B.** *J Clin Invest* 1998,101:1163-1174.
223. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. **Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001,98:13884-13888.
224. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. **Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001,98:13884-13888.
225. Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM. **Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta.** *Gastroenterology* 2000,119:1209-1218.
226. Weissmann A. **Essays upon Hereditary and Kindred Biological Problems.** Oxford: 25 Oxford Press; 1889.
227. Xu Y, Bialik S, Jones BE, Limuro Y, Kitsis RN, Srinivasan A, *et al.* **NF-kB inactivation converts a hepatocyte cell line TNF-a response from proliferation to apoptosis.** *Am J Pathol* 1998,275:C1058-C1066.
228. Yang E, Korsmeyer SJ. **Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death.** *Blood* 1996,88:386-401.
-

-
229. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. **Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition.** *Hepatology* 2001,33:616-626.
230. Yoon JH, Gores GJ. **Death-receptor-mediated apoptosis and the liver.** *J Hepatol* 2002,37(3):400-410.
231. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. **The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation.** *Cell* 1997,91:243-252.
232. Zollner G, Fickert P, Silbert D, *et al.* **Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis.** *J Hepatol* 2003,38:717-727.
233. Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G. **Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis.** *Biochem Biophys Acta* 2001,1551:F1-F37.
234. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. **Apaf-1, a human protein homologous to C.elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.** *Cell* 1997,90:405-413.
235. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. **An Apaf-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.** *J Biol Chem* 1999,274:11549-11556.
-

9. Lebenslauf

Personalien

Name: Carina Anna Bernt
Geburtsdatum: 16.09.1977
Geburtsort: Rosenheim

Promotion

seit 07/2003 Promotion zum Dr. rer. biol. hum. an der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. U. Beuers, Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern

Hochschulstudium

04/2003 Abschluss Diplom-Biologin
Note: mit Auszeichnung bestanden

05/2002 - 04/2003 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, bei PD Dr. S. Grimm. Thema: „Geninaktivierung und Ermittlung von Interaktionspartnern bei dem neuen Apoptose-induzierenden Protein Spike“
Note: sehr gut

05/2001 - 08/2001 Auslandspraktikum bei Prof. P. Krishna, Dept. of Plant Sciences, University of Western Ontario, London, Kanada

11/1997 – 04/2003 Studium an der Technischen Universität München
Hauptfach: Biochemie und Zellbiologie
Nebenfächer: Genetik und medizinische Virologie

Schulausbildung

09/1988 – 07/1997 naturwissenschaftliches Karolinen-Gymnasium, Rosenheim
Abschluss: Abitur
Note: 2,0

09/1984 - 07/1988 Grundschule Aising, Rosenheim

10. Publikationsliste

1. Bernt C, Vennegerts T, Beuers U, Rust C. **Glycochenodeoxycholic Acid Induces Transcription of CFOS/JUNB in a Human Hepatoma Cell Line.** *Z Gastroenterol* 2005; 43:850, P254.
 2. 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, 340:800-806.
 3. 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, 55:719-727.
-