

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

# **Molekulare Mechanismen und Modulation der Gallensäuren- induzierten Apoptose in einer humanen Hepatomzelllinie**

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

Vorgelegt von

**Nadine Yvonne Wild**

aus  
München

**2009**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Beuers

Mitberichterstatter: PD Dr. med. M. Schaffer  
PD Dr. med. B. Bachmeier

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. C. Rust

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2009

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

*„Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.“*

Albert Einstein (1879 – 1955)

# INHALTSVERZEICHNIS

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG.....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1      | <b>Apoptotischer Zelltod.....</b>                                     | <b>5</b>  |
| 1.1.1    | Bedeutung der Apoptose für den Organismus.....                        | 6         |
| 1.1.2    | Molekulare Grundlagen und Signalwege der Apoptose.....                | 7         |
| 1.1.2.1  | <i>Rezeptor-vermittelter (extrinsischer) Signalweg.....</i>           | <i>7</i>  |
| 1.1.2.2  | <i>Mitochondrialer (intrinsischer) Signalweg.....</i>                 | <i>9</i>  |
| 1.1.2.3  | <i>Caspasen .....</i>   | <i>11</i> |
| 1.1.2.4  | <i>Bcl-2 Familie .....</i>  | <i>14</i> |
| 1.1.2.5  | <i>Typ-I- und Typ-II-Zellen.....</i>                                  | <i>15</i> |
| 1.1.3    | Hepatozelluläre Apoptose.....   | 18        |
| 1.2      | <b>Cholestase .....</b>   | <b>20</b> |
| 1.2.1    | Chronisch cholestatische Lebererkrankungen.....                       | 20        |
| 1.2.2    | Zusammensetzung der Galle .....                                       | 21        |
| 1.2.3    | Bildung und Sekretion der Galle .....                                 | 22        |
| 1.2.4    | Unterschiedliche Formen der Leberzellschädigungen bei Cholestase..... | 24        |
| 1.2.5    | Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Apoptose in Hepatozyten..... | 25        |
| 1.3      | <b>Steatosis hepatis.....</b>   | <b>29</b> |
| 1.3.1    | Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH).....                        | 29        |
| 1.3.2    | Pathogenese und Therapie .....  | 30        |
| 1.4      | <b>Fragestellung der Arbeit.....</b>                                  | <b>33</b> |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                    | <b>34</b> |
| 2.1      | <b>Material.....</b>  | <b>34</b> |
| 2.1.1    | Zelllinie.....  | 34        |
| 2.1.2    | Puffer und Lösungen .....   | 34        |
| 2.1.3    | Antikörper .....  | 35        |
| 2.1.4    | Sonstige Materialien, Chemikalien und Biochemikalien.....             | 35        |
| 2.2      | <b>Methoden .....</b>   | <b>37</b> |
| 2.2.1    | Isolation und Kultivierung von primären Rattenhepatozyten .....       | 37        |
| 2.2.2    | Kultivierung von HepG2-Ntcp Zellen.....                               | 38        |
| 2.2.3    | Stabile Transfektion der humanen HepG2 Zellen mit einem pcDNA .....   | 38        |

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.2.4      | Transiente Transfektion von RNA-Oligonukleotiden in HepG2-Ntcp Zellen .....                                 | 39        |
| 2.2.5      | Herstellung von Gesamtzelllysaten .....   | 40        |
| 2.2.6      | Bestimmung der Proteinkonzentration.....  | 40        |
| 2.2.7      | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....   | 40        |
| 2.2.8      | Western-Blot.....   | 41        |
| 2.2.9      | Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7-Aktivitätsassay .....   | 42        |
| 2.2.10     | Verfettung von Zellen .....   | 43        |
| 2.2.11     | Sudanfärbung.....   | 44        |
| 2.2.12     | Nilrot-Fluoreszenzmikroskopie.....  | 44        |
| 2.2.13     | Fettquantifizierung mittels Nilrot .....  | 45        |
| 2.2.14     | Statistik .....   | 45        |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Untersuchung der Gallensäuren-induzierten Apoptose im Modell der humanen Hepatomzelllinie HepG2.....</b> | <b>46</b> |
| 3.1.1      | Aktivierung der Caspase-3,-6,-7,-8 und -9 bei Stimulation mit GCDCA.....                                    | 46        |
| 3.1.2      | Blockierung der Caspase-6 mit dem spezifischen Inhibitor Z-VEID-FMK.....                                    | 47        |
| 3.1.3      | Inhibierung der Caspase-6-Expression durch siRNA Transfektion.....  | 50        |
| 3.1.3.1    | <i>Zeitkinetik</i> .....  | 51        |
| 3.1.3.2    | <i>Effekt von GCDCA</i> .....   | 51        |
| 3.1.3.3    | <i>Effekt von TLCA</i> .....  | 55        |
| 3.1.3.4    | <i>Effekt von Etoposid bzw. TNF-<math>\alpha</math> und Actinomycin D</i> .....                             | 57        |
| 3.1.4      | Blockierung der Caspase-9 mit dem spezifischen Inhibitor Z-LEHD-FMK.....                                    | 59        |
| 3.1.5      | Inhibierung der Caspase-9-Expression durch siRNA-Transfektion.....  | 61        |
| 3.1.5.1    | <i>Zeitkinetik</i> .....  | 61        |
| 3.1.5.2    | <i>Effekt von GCDCA</i> .....   | 62        |
| <b>3.2</b> | <b>Untersuchung der Gallensäuren-induzierten Apoptose bei Steatose in einem Zellkulturmodell .....</b>      | <b>65</b> |
| 3.2.1      | Zelluläre Steatose durch Inkubation mit langkettigen Fettsäuren.....  | 65        |
| 3.2.2      | Unterschiedliche apoptotische Wirkung langkettiger Fettsäuren.....  | 67        |
| 3.2.3      | Effekt von GCDCA in steatotischen Hepatozyten.....  | 68        |
| 3.2.4      | Effekt von TLCA in steatotischen Hepatozyten .....  | 70        |
| 3.2.5      | Abhängigkeit der Apoptoserate vom Grad der Steatose .....   | 71        |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Molekulare Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Apoptose in humanen Hepatozyten .....</b>            | <b>75</b> |
| 4.1.1      | Caspase-6 ist Caspase-3, -7 und -8 vorgeschaltet.....   | 78        |
| 4.1.2      | Caspase-6 ist Caspase-9 nachgeschaltet.....   | 83        |

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 4.1.3      | Zusammenfassung.....   | 84         |
| <b>4.2</b> | <b>Gallensäuren-induzierte Apoptose in steatotischen Hepatozyten .....</b>                             | <b>86</b>  |
| 4.2.1      | In vitro Modell der Gallensäuren-induzierten Apoptose bei Steatose .....                               | 89         |
| 4.2.2      | Gesteigerte Empfindlichkeit steatotischer Hepatozyten gegenüber Gallensäuren-induzierter Apoptose..... | 91         |
| 4.2.3      | Zusammenfassung.....   | 92         |
| <b>5</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>6</b>   | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>7</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>100</b> |
| <b>8</b>   | <b>LEBENS LAUF .....</b>   | <b>115</b> |
| <b>9</b>   | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>117</b> |





# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Apoptotischer Zelltod

Apoptose ist eine hochorganisierte und genetisch kontrollierte Form des Zelltods, die sowohl für die Embryonalentwicklung als auch für die Gesundheit des erwachsenen Organismus essentiell ist. Der Begriff Apoptose (apo = ab, weg los; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst. Das Phänomen der Apoptose ist schon seit Jahrzehnten bekannt, aber erst durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose, von Kerr et al. im Jahre 1972, wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose geprägt.<sup>1-5</sup> Fünf Jahre später wurden beim Fadenwurm *C. elegans* die ersten Gene entdeckt, die für die Apoptose verantwortlich sind.<sup>6,7</sup> Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt und ist Teil des Zellstoffwechsels. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle und es wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht.

Charakteristisch für den apoptotischen Zelltod sind morphologische Veränderungen der Zelle, wie die Loslösung der Zelle aus dem Zellverband, die Kondensation und Abgrenzung des Kernchromatins, die Schrumpfung der Zelle und die Blasenbildung der Plasmamembran (sog. „membrane blebbing“). Diese werden begleitet von einer Reihe von biochemischen Kennzeichen, wie die DNA-Fragmentation, der Umbau der Plasmamembran und der Abbau einer Reihe von spezifischen zellulären Proteinen durch die Aktivierung einer großen Zahl an intrazellulären Proteasen und Endonukleasen. Die DNA wird zunächst in 50- bis 300-Kb Stücke und dann weiter in kleinere 180 bis 200 Basenpaarfragmente zerschnitten. Diese DNA-Fragmente sind für das klassische Leiternmuster, das in apoptotischen Zellen mittels Elektrophorese nachgewiesen werden kann, verantwortlich.<sup>8,9</sup> Zuletzt zerfällt die Zelle in von

Membran umgebene Vesikel, sog. apoptotische Körperchen, die die teilweise intakten Organellen und Chromatinresiduen enthalten. Beim Umbau der Plasmamembran werden Phosphatidylserine, die sich normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran befinden, auf die Außenseite transloziert. Dieses Signal wird von den umgebenden Zellen und von spezialisierten Phagozyten wie Makrophagen oder den Kupferzellen der Leber erkannt, die dann die apoptotischen Körperchen phagozytieren. Dieser ganze Prozess der Apoptose dauert nur einige Minuten bis wenige Stunden.<sup>10-13</sup>

## 1.1.1 Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Die Apoptose ist für den vielzelligen Organismus eine wichtige Möglichkeit, sich selbst zu organisieren und zu erhalten. Bereits während der Embryonalentwicklung spielt der gezielte apoptotische Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle.<sup>14,15</sup> So erfolgt während der Entwicklung des Embryos die Formgebung von Körper und Organen durch Apoptose, beispielsweise werden die Häute zwischen Zehen und Fingern in der menschlichen Embryonalentwicklung apoptotisch entfernt.<sup>15</sup> Nervenzellen werden in der Embryonalentwicklung des Menschen zuerst im Überschuss produziert und gehen anschließend durch Apoptose wieder zugrunde (40-85 %), wenn sie keinen Kontakt mit benachbarten Neuronen herstellen konnten. Später zeigt das Zentralnervensystem nur noch eine geringe Zelleliminationsrate.<sup>15</sup>

Eine besondere Bedeutung hat die Apoptose bei der Selektion von Keimzellen (Eizellen und Spermien). Jede krankhafte Veränderung im genetischen Material dieser Zellen würde sich unweigerlich auf die Nachkommen übertragen. Hier ist ein besonders strenges Kontrollsystem erforderlich. Daher werden auch rund 95 % der Keimzellen vor dem Erreichen ihrer Reife apoptotisch und anschließend resorbiert.<sup>15,16</sup>

Das Apoptoseprogramm spielt eine wichtige Rolle bei der Elimination von autoreaktiven oder inkompetenten Immunzellen, von Zellen, die durch mutagene Agenzien geschädigt wurden und tumorartig entarten können, und von virusinfizierten Zellen.<sup>17</sup>

Nur wenn die Neubildung und Eliminierung der Zellen im Gleichgewicht stehen, bleibt der Organismus gesund. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, sind

krankhafte Erscheinungen wie Krebs oder Autoimmunerkrankungen die Folge. Eine zu niedrige Apoptoserate kann z. B. zu Autoimmunstörungen oder zur Proliferation entarteter Zellen, d. h. zur Bildung von Tumoren führen.<sup>18</sup> Übermäßige Apoptose findet sich bei AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson.<sup>19</sup>

Auch in Bezug auf Lebererkrankungen spielt Apoptose eine wichtige Rolle. Eine erhöhte Apoptoserate kann zur Leberschädigung führen. Dies wurde beispielhaft in einem Experiment gezeigt, in dem Apoptose in Mäusen durch einen Fas-Antikörper induziert wurde, was zum fulminanten Leberversagen führte.<sup>20</sup> Außerdem spielt Apoptose auch eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des Hepatozellulären Carcinom (HCC), das mit der Mutation von p53 einhergeht.<sup>21</sup> Neuste Behandlungsstrategien haben daher zum Ziel, die Apoptose bei bestimmten Lebererkrankungen zu inhibieren und auf der anderen Seite in malignen Lebertumoren selektiv anzuschalten.

Diese Beispiele machen deutlich, wie wichtig Apoptose für den Organismus ist und welche fatalen Folgen Fehler in der Regulation der Apoptose haben können.

## **1.1.2 Molekulare Grundlagen und Signalwege der Apoptose**

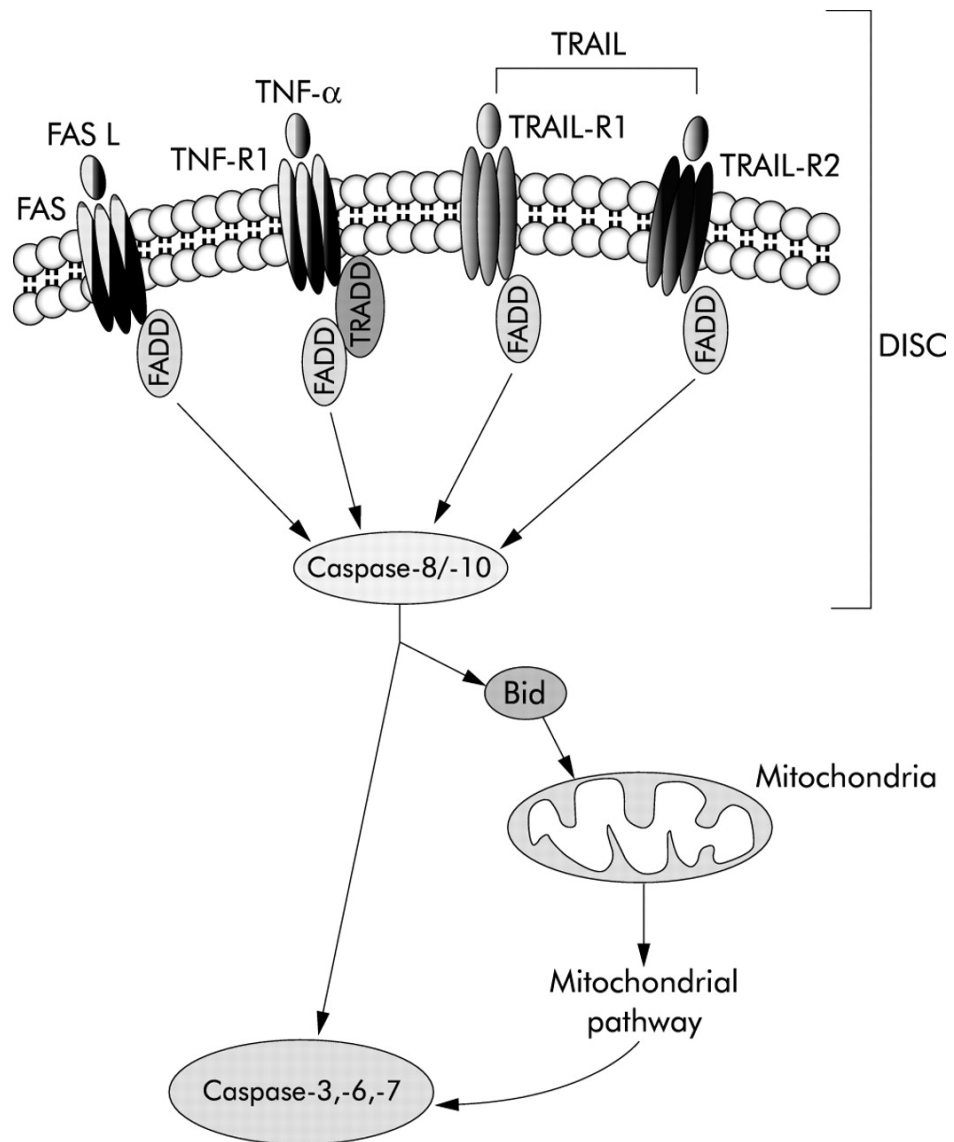
Je nach Zelltyp und Auslöser kann Apoptose durch zwei verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Die gemeinsame Endstrecke beider Wege ist die Aktivierung einer großen Zahl intrazellulärer Proteasen (eine Gruppe proteolytischer Enzyme, die auch Caspasen genannt werden) und Endonukleasen, die letztendlich die zellulären Bestandteile abbauen und die ihrerseits unumkehrbar den Zelltod einleiten.

### *1.1.2.1 Rezeptor-vermittelter (extrinsischer) Signalweg*

Der extrinsische Signalweg beginnt an der Familie der Zytokinrezeptoren, die auch Todesrezeptoren genannt werden und sich an der Plasmamembran der Zelle befinden. Es sind derzeit acht Todesrezeptoren bekannt. Von ihnen sind der TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor 1), Fas (CD95/Apo1), TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (necrosis

factor related apoptosis inducing ligand receptor 1 and 2) die am besten beschriebenen Rezeptoren. An diese Rezeptoren binden die entsprechenden Liganden (TNF- $\alpha$ , Fas Ligand (FasL)/CD95L, TRAIL). Anschließend wird ein Adapterprotein (z. B. FADD, TRADD, RIP, TRAF-2) durch Interaktion von Todesdomänen rekrutiert. Der gebildete Komplex aus Rezeptor (z. B. Fas), Adapterproteinen (z. B. „Fas-associated death domain“, FADD) und Proenzymen (z. B. Caspase-8 oder -10) wird auch als „death inducing signalling complex“ (DISC) bezeichnet. FADD interagiert über eine DD (death domain) mit dem Fas-Rezeptor und über eine DED (death effector domain) mit der Procaspase. Dadurch wird die Procaspase autoproteolytisch prozessiert und es entsteht die aktive, freigesetzte Caspase, die die Caspasen-Kaskade einleitet.<sup>2,8,22</sup>

Der extrinsische Reaktionsweg unterliegt der Regulation durch die sog. „Flip-inhibitory proteins“ (c-Flip). Die Proteine dieser Familie können zum einen die Ausbildung des DISC kompetitiv hemmen und zum anderen die proteolytische Aktivierung der Caspase-8 blockieren.<sup>23</sup>



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der Todesrezeptoren-induzierten (extrinsischen) Signalwege der Apoptose.<sup>2</sup>

### 1.1.2.2 Mitochondrialer (intrinsischer) Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird ausgelöst durch eine Reihe extra- und intrazellulärer Signale, wie z. B. UV-Strahlung,  $\gamma$ -Strahlung, oxidativer Stress, der zur Bildung von „reactive oxygen species“ (ROS) führt, Wachstumsfaktorenverlust, oder einige Chemotherapeutika, die eine mitochondriale Dysfunktion induzieren. Dadurch wird die Architektur der Zellorganellen sowie die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran verändert, was auch „mitochondrial permeability transition“ (MPT) genannt wird.

An den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Membran der Mitochondrien befinden sich komplexe, normalerweise kontrollierte Kanäle, die mit PTP (permeability transition pore) bezeichnet werden. Diese Kanäle werden durch die Änderung des Membranpotentials der Mitochondrien geöffnet und somit können kleine Moleküle (<1500 Da) durch die innere Membran treten. Diese führen dann zum Anschwellen der mitochondrialen Matrix und zur Ruptur der äußeren Membran.<sup>24-27</sup>

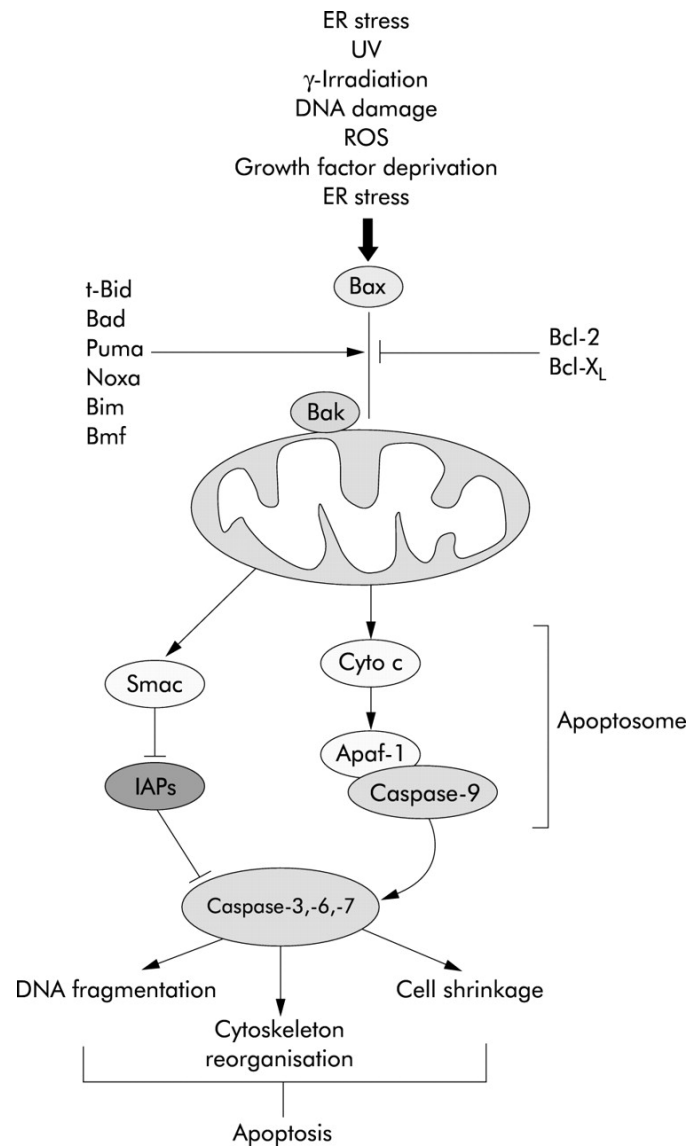
Dadurch werden die mitochondrialen Proteine ins Zytosol ausgeschüttet, insbesondere die proapoptischen Faktoren, wie Cytochrom c, SMAC/DIABLO (second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI), HtrA2/Omi, AIF (apoptosis inducing factor) und die EndoG (Endonuklease G).

Cytochrom c bindet dann an Apaf-1 (apoptosis associated factor 1) und bildet mit der rekrutierten Caspase-9 das sog. Apoptosom. In diesem Komplex wird die Procaspase-9 ATP-abhängig aktiviert. Sie aktiviert wiederum die Caspasen-3, -6 und -7.<sup>2,8,28</sup> Die Caspase-3 spaltet schließlich zelluläre Substrate, die zum morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose führen. Aus diesem Grund wird die Caspase-3 neben zwei weiteren Caspasen (Caspase-6 und -7) auch als Effektorcaspase bezeichnet.<sup>29</sup> Zu diesen zellulären Substraten gehören viele Proteine, wie Aktin, Gelsolin oder Fodrin, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind.<sup>30,31</sup> Darüber hinaus spalten und inaktivieren die Effektorcaspasen Faktoren, die normalerweise DNA-spaltende Endonukleasen (DFF45/ICAD, PARP) hemmen.<sup>32</sup> Dies bewirkt, dass die Endonukleasen im Zellkern die chromosomale DNA in die für Apoptose charakteristischen Oligonukleosomen-großen Fragmente spalten.

SMAC/DIABLO binden und aktivieren den endogenen „inhibitor of caspases“ (IAPs) und hindern ihn, die aktiven Caspasen zu hemmen.<sup>2,33,34</sup>

Der AIF transloziert zum Zellkern und induziert dort unabhängig von der Aktivierung der Caspasen die Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung der DNA.<sup>35,36</sup>

Auch die EndoG führt, nach ihrer Freisetzung aus den Mitochondrien, zu einer Zerschneidung der zelleigenen DNA.<sup>37-39</sup>



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung des mitochondrialen (intrinsischen) Signalwegs der Apoptose.<sup>2</sup>

### 1.1.2.3 Caspasen

Apoptose wird von einer Kaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die der Familie der „cysteinyll aspartate-specific proteases“ (Caspasen). Caspasen sind durch die Evolution stark konserviert und finden sich in allen zur Apoptose fähigen Organismen. Es sind derzeit 14 verschiedene Caspasen in

Säugetieren identifiziert worden, 12 davon finden sich auch beim Menschen. Die Caspasen-11 und -12 konnten bis jetzt nur in der Maus und noch nicht im Menschen nachgewiesen werden.<sup>40</sup> Nicht alle Caspasen sind für Apoptose zuständig.<sup>1,29,41</sup> Caspase-1,-4,-5, und -11 spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen. Dies ist sehr wichtig, da Inhibitoren die alle Caspasen ausschalten (sog. Pancaspaseinhibitoren), nicht nur die Caspasenkaskade bei Apoptose beeinträchtigen, sondern auch die bei vielen Entzündungsprozessen.<sup>2,8</sup>

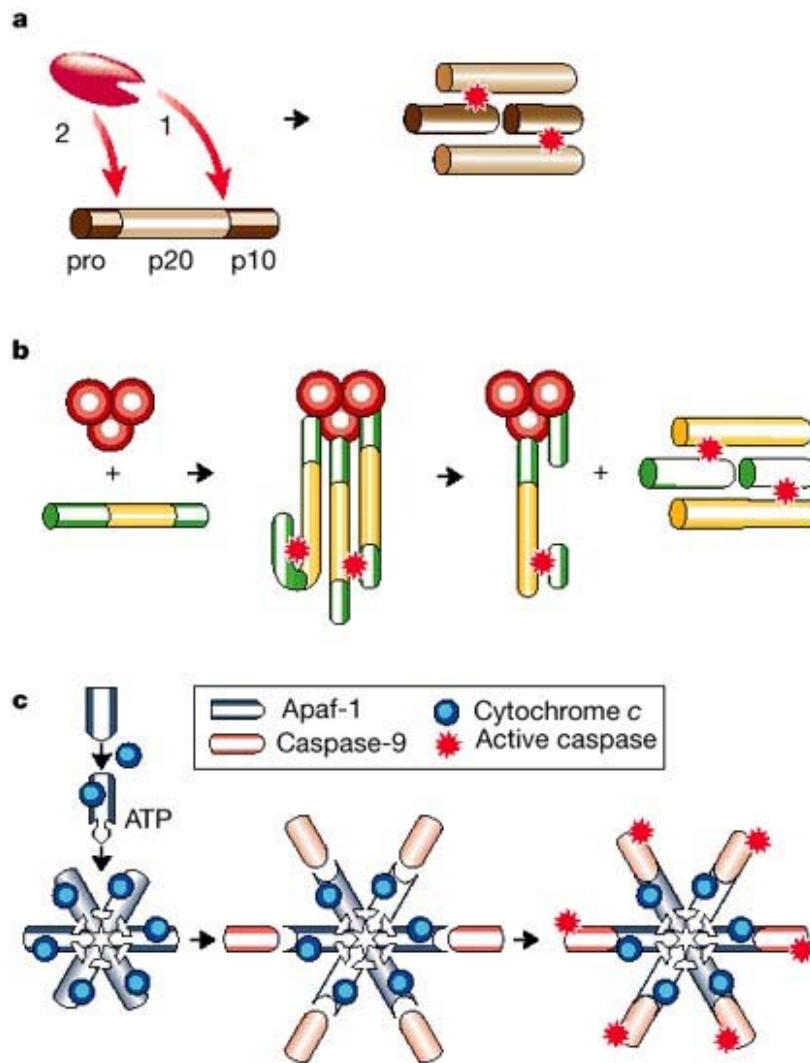
Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Caspasen werden als Zymogene (inaktive Enzymvorstufen, 30 bis 50 kD) exprimiert und bestehen aus drei Domänen: der NH<sub>2</sub>-terminalen Prodomäne, gefolgt von einer großen Untereinheit (17-22 kD), und einer kleinen Untereinheit (10-24 kD). Sie werden selber auch durch Proteolyse am Aspartat aktiviert. Deshalb können sich Caspasen nicht nur untereinander, sondern auch selber aktivieren. Nach der Aktivierung lagern sich zunächst die beiden Untereinheiten zu einem  $\alpha\beta$ -Heterodimer zusammen. Danach bilden zwei Dimere ein  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer mit zwei katalytischen Zentren.<sup>29,40</sup>

Abhängig von der Struktur der Prodomäne und ihrer Funktion können Caspasen in drei Gruppen eingeteilt werden. Zu den Caspasen mit längeren Prodomänen zählen die an Entzündungsreaktionen beteiligten Caspasen (Gruppe I) und die Initiatorcaspasen der Apoptose (Gruppe II). Caspasen mit kürzeren Prodomänen von 20 bis 30 Aminosäuren werden als Effektorcaspasen bezeichnet (Gruppe III).<sup>4</sup>

Die Aufgabe der Initiatorcaspasen (2, 8, 9 und 10) ist die Weiterleitung und Verstärkung des Apoptosesignals. Die Effektorcaspasen (3, 6, und 7) sind für die Zerstörung der zellulären Strukturen, wie die Zerstörung des Zellkerns, den Abbau des Zytoskeletts und die Blasenbildung der Membran, verantwortlich. Initiatorcaspasen werden durch ihre Rekrutierung an spezifische Proteinkomplexe (z. B. Caspase-8 am Todesrezeptorkomplex oder Caspase-9 am Apoptosom) prozessiert und damit aktiviert. Einmal aktivierte Initiatorcaspasen, wie im extrinsischen Signalweg die Caspase-8 oder im intrinsischen die Caspase-9, spalten die Effektorcaspasen und führen so zu deren Aktivierung. Die aktivierten Effektorcaspasen spalten nukleare Proteine, die morphologische Veränderungen der Zelle verursachen und den Tod der Zelle herbeiführen.<sup>29,42</sup>



Es gibt drei unterschiedliche Aktivierungsmöglichkeiten der Caspasen. Die erste besteht in der proteolytischen Spaltung am Aspartat. Auf diese Weise werden die am Ende der Kaskade liegenden Effektorcaspasen (downstream) durch die Initiatorcaspasen (upstream) aktiviert. Beim zweiten Mechanismus führt die Rekrutierung mehrerer Procaspase-Moleküle in nächster Nähe zur gegenseitigen Aktivierung. Zu der hohen lokalen Konzentration kann es zum Beispiel kommen, indem mehrere Moleküle der Procaspase-8 oder -10 an dasselbe Molekül, wie z. B. FADD, binden. Die sehr geringe Eigenaktivität der Procaspase-8 reicht dann aus, um eine andere Procaspase zu schneiden und somit zu aktivieren.<sup>43,44</sup> Die dritte Möglichkeit ist die Aktivierung einer Caspase, über die Bildung eines Holoenzym, wie es bei Caspase-9 der Fall ist. Cytochrom c, Apaf-1, dATP und Procaspase-9 bilden das sog. Apoptosom und in diesem Komplex wird die Procaspase-9 nicht durch Proteolyse, sondern durch strukturelle Veränderungen aktiviert. Caspase-9 verbleibt im Apoptosom und schneidet weitere Caspasen.<sup>1,45,46</sup>



**Abbildung 3. Darstellung der drei unterschiedlichen Möglichkeiten der Aktivierung von Caspasen: (a) durch eine bereits aktivierte Caspase, (b) durch induzierte Nähe oder (c) durch die Ausbildung eines Holoenzymkomplexes.<sup>1</sup>**

#### 1.1.2.4 Bcl-2 Familie

In der Regulation des apoptotischen Zelltods sind auch die Proteine der Bcl-2 Familie von großer Bedeutung, zu denen sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine gehören. Sie sind den Mitochondrien vorgeschaltet und somit wichtige Regulatoren des intrinsischen Signalwegs. Ihre wechselseitigen Interaktionen legen fest, ob der intrinsische Weg der Apoptose aktiviert wird oder nicht.

Es gibt mindestens 20 verschiedene Bcl-Proteine, die eine Sequenzhomologie in einer der vier Domänen besitzen, die „Bcl-2 homology“ (BH)-Domänen 1 bis 4. Es gibt die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-1 und A1, deren Wirkung weitgehend unklar ist. Bisher ist nur bekannt, dass sie an eine Reihe proapoptotischer Bcl-Proteine direkt binden und diese somit inaktivieren.<sup>47</sup> Daneben gibt es noch die proapoptotischen Proteine, wie Bax, Bak, und die „BH3 only proteins“, wie Bid, Bad, Bim, Noxa und Puma.

In gesunden Zellen befindet sich Bax als ein Monomer im Zytosol. Nach einem apoptotischen Stimulus verändert sich die Struktur von Bax, es wird in die äußere Mitochondrienmembran eingebettet und macht die Membran permeabel. Bak ist ein oligomerisches mitochondriales Membranprotein, das während der Apoptose in seiner Struktur verändert wird und größere Aggregate bildet.

Die „BH3 only“-Proteine, die wiederum Bax und Bak aktivieren, werden direkt durch spezifische Todessignale aktiviert. Die Aktivierung von Bak oder Bax ist notwendig für die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und somit für die Apoptose der Zelle.

Das „BH3 only“-Protein Bid stellt außerdem eine Verbindungsstelle zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Weg da. Bid wird von Caspase-8 aktiviert und dann zu den Mitochondrien transloziert, wo es Bax und Bak aktiviert und somit die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran herbeiführt.<sup>2</sup>

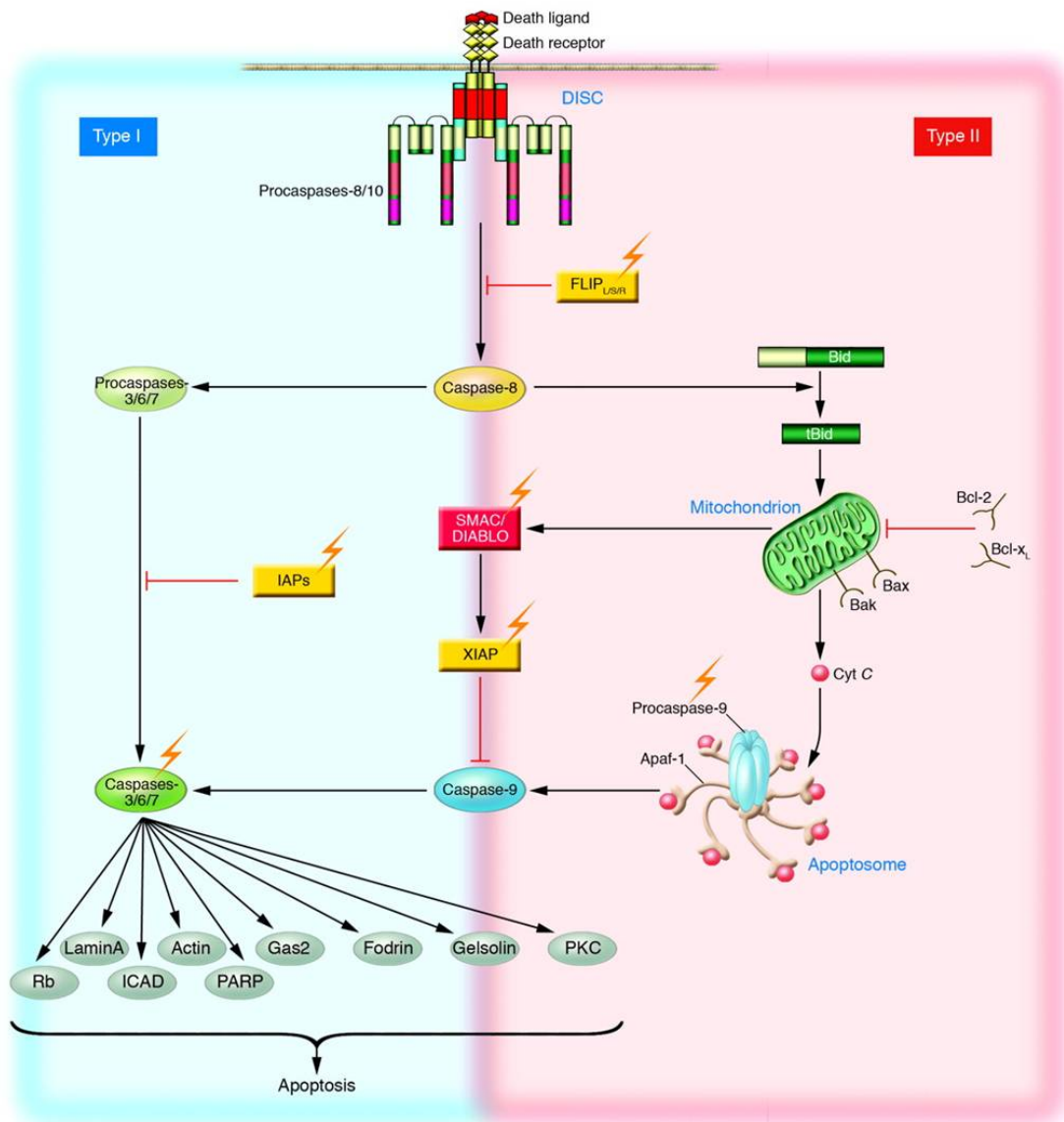
### 1.1.2.5 *Typ-I- und Typ-II-Zellen*

In der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose unterscheidet man zwei Typen von Zellen. In den so genannten Typ-I-Zellen sind charakteristischer Weise der DISC-Komplex und die aktive Caspase-8 sehr stark exprimiert. Die aktive Caspase-8 aktiviert direkt die Effektorcaspasen-3 und -7 und leitet unabhängig von den Mitochondrien den Tod der Zelle ein.

In Typ-II-Zellen, bei denen die Expression von DISC und Caspase-8 wesentlich schwächer ist, muss das apoptotische Signal über die Aktivierung der Mitochondrien verstärkt werden.<sup>4</sup> In diesem Zelltyp kommt es nur geringfügig zu einer Rezeptorkomplex-Bildung und dadurch wird auch nur wenig Procaspase-8 gespalten.

Die Induktion der Apoptose erfolgt in Typ-II-Zellen überwiegend über die Mitochondrien, was zu einer zeitlich verzögerten Spaltung der Procaspase-3 durch Caspase-9 führt.<sup>48</sup> Das Protein Bid aus der Bcl-2-Familie wird von der Caspase-8 aktiviert, transloziert zu den Mitochondrien und induziert dann, in Zusammenarbeit mit den proapoptischen Proteinen Bax und Bak, die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien.<sup>49</sup>

Durch die Freisetzung des Cytochrom-c kommt es zur Ausbildung des Apoptosoms, der Aktivierung der Caspase-9, die wiederum die Effektorcaspasen aktiviert, die dann den Zelltod initiieren. Hepatozyten und Cholangiozyten werden beispielsweise zu den Typ-II-Zellen gezählt. Sie können ohne eine mitochondriale Beteiligung nicht in Apoptose gehen.<sup>2</sup>



**Abbildung 4. Apoptosesignale in Typ-I- und Typ-II-Zellen.** Beim Todesrezeptor-vermittelten Signalweg führt die Formation des DISC-Komplexes zur Aktivierung der Caspase-8. Danach gibt es je nach Zellart, zwei mögliche Signalwege. In Typ-I-Zellen (hellblau) proteolysiert Caspase-8 direkt die Caspase-3, die den Zelltod initiiert. In Typ-II-Zellen (rosa) ist ein sogenannter „amplification loop“ notwendig, d. h. über die Aktivierung von tBid wird der intrinsische Signalweg zusätzlich aktiviert. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, Bildung des Apoptosoms, Aktivierung der Caspase-9 und durch die Proteolyse der Effektorcaspasen (hellgrün) zum Zelltod. Dabei kann an mehreren Stellen regulatorisch in die Caspasen-Kaskade eingegriffen werden. Die Aktivierung der Caspasen am DISC kann durch das c-Flip Protein verhindert werden. Die IAPs können die Aktivierung der Effektorcaspasen verhindern.<sup>4</sup>

## 1.1.3 Hepatozelluläre Apoptose

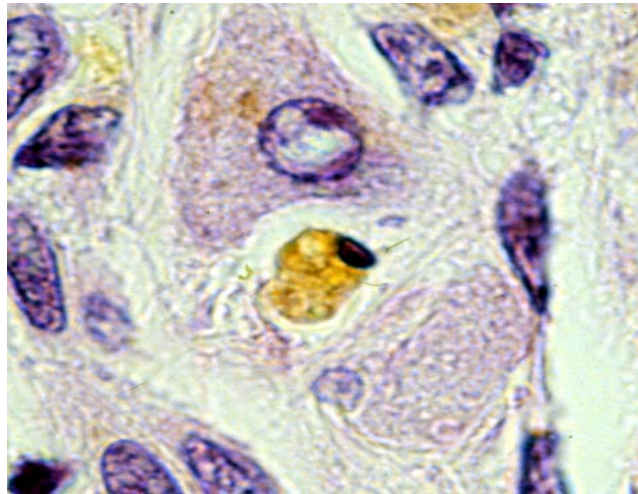
Apoptose spielt bei vielen Erkrankungen der Leber eine wichtige Rolle. Dazu zählen die alkoholinduzierte Steatohepatitis (ASH), die virale Hepatitis, das hepatozelluläre Karzinom (HCC), die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) und die cholestatischen Lebererkrankungen.<sup>2,8,50</sup> Auf die zwei letzteren wird später noch genauer eingegangen. (s. Kapitel 1.2 und 1.3)

In histologischen Präparaten der Leber sind charakteristische Merkmale der Apoptose erkennbar. Die apoptotischen Leberzellen sehen lichtmikroskopisch in Haematoxylin- und Eosin-gefärbten Lebergewebsschnitten aus wie runde, azidophile Körper, die sich von den umgebenden Zellen losgelöst haben. Ihr Nukleus erscheint pyknotisch oder fragmentiert. Diese azidophilen Körper entsprechen den „apoptotic bodies“, und sind schon seit langer Zeit in einer ganzen Reihe von Lebererkrankungen als „Councilman bodies“ beschrieben worden.<sup>8,51</sup>

Im Gegensatz zur Nekrose verbleiben bei der Apoptose die intrazellulären Bestandteile in den membranumschlossenen apoptotischen Körpern. Deshalb werden apoptotische Zellen meist ohne eine inflammatorische Antwort eliminiert. Bei hepatozellulärer Apoptose scheint dies nicht immer der Fall zu sein. Wenn das Ausmaß der Apoptose den Abbauprozess der „apoptotic bodies“ übersteigt, kommt es zu einem Gewebeerlust mit einer inflammatorischen Antwort. Dies konnte beispielhaft belegt werden, indem man intrazelluläre Enzyme im apoptotischen Lebergewebe nachweisen konnte. Deshalb scheint die Apoptose eine wichtige Rolle bei vielen Erkrankungen zu spielen, für die in der Vergangenheit die Nekrose verantwortlich gemacht wurde.<sup>52,53</sup>

In der Leber spielen sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg eine wichtige Rolle. In allen Typen von Leberzellen sind Todesrezeptoren, und insbesondere Fas sehr stark exprimiert. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Zellen im Laufe der Evolution gelernt haben, auf diese Weise die hepatotropen Viren zu eliminieren. So ist zum Beispiel das Fas/FasL-System der Weg, der gewöhnlich von den Immunozyten genutzt wird, die mit Viren infizierten Zellen zu töten.<sup>2,54</sup>

Bei Hepatozyten und Cholangiozyten sind die Mitochondrien für den Ablauf der Apoptose unabdingbar, weshalb sie auch zu den Typ-II-Zellen gezählt werden. Die Spaltung von Bid und die damit verbundene Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweg ist für diese Zellen von essentieller Bedeutung.<sup>48</sup> Fas führt sowohl in Typ-I- als auch in Typ-II-Zellen zur Apoptose und zur Aktivierung der Mitochondrien. Durch die Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub>, kann allerdings nur in Typ-II-Zellen die Apoptose vollständig blockiert werden. Desgleichen kann Fas in Hepatozyten von Bid-defizienten Mäusen keine Apoptose induzieren.<sup>4,48,55,56</sup>



**Abbildung 5. Bild einer apoptotische Leberzelle.** Auf Grund der Anreicherung des Bilirubin ist sie gelb gefärbt. Es sind die für Apoptose typischen morphologischen Zeichen zu sehen: Schrumpfung der Zellen, Abbau des Zytoskeletts, Abrundung der Zelle und Kondensation des Zellkerns.

## 1.2 Cholestase

Als Cholestase bezeichnet man die Beeinträchtigung des Gallenflusses, die zum einen zu einer Retention von Gallensäuren, Bilirubin und anderen gallenpflichtigen Substanzen in Leber und Blut, und zum anderen zum Mangel funktionell wichtiger Gallensäuren im Darm führt. Sie ist häufig assoziiert mit klinischen Merkmalen, wie Ikterus, Pruritus und Veränderungen von Laborparametern, wie eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase und der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase im Serum. Es gibt unterschiedliche Formen von Cholestase, die beispielsweise verursacht werden durch die Beeinträchtigung der Gallensäuresekretion, durch die mechanische Behinderung des Gallenflusses oder durch eine Kombination von beiden.<sup>57,58</sup>

### 1.2.1 Chronisch cholestatische Lebererkrankungen

Die Cholestase ist führendes Kennzeichen einer Reihe von Krankheitsbildern, die als chronisch cholestatische Lebererkrankungen bezeichnet werden.<sup>59</sup> Dazu gehören vor allem die im Erwachsenenalter dominierende primär biliäre Zirrhose (PBC) und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC). Des Weiteren gibt es noch angeborene Erkrankungen, wie die progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC) Typ 1-3, die benigne rezidivierende intrahepatische Cholestase (BRIC), die Gallengangsatresie, das Alagille Syndrom und die Zystische Fibrose, die zu einer chronischen Cholestase führen können und meist bereits im Kindesalter symptomatisch werden. Ebenso können Medikamente und Hormone ein chronisch cholestatisches Krankheitsbild hervorrufen.<sup>57,59</sup> Nicht selten entwickeln die Patienten eine biliäre Leberzirrhose. Im Endstadium ist die Lebertransplantation die einzige kurative Therapieoption. Cholestatische Erkrankungen sind gekennzeichnet durch typische Symptome, wie Ikterus, Juckreiz, Müdigkeit, Hyperlipidämie und alle Komplikationen der portalen Hypertonie.<sup>57,59,60</sup>

Die primär biliäre Zirrhose (PBC) ist von den chronisch cholestatischen Erkrankungen die häufigste und am besten untersuchte Erkrankung. Bei PBC-Patienten wurde gezeigt, dass die Langzeitbehandlung mit Ursodeoxycholsäure (UDCA) die



Serumleberwerte verbessert, die histologische Progression und die Zirrhosebildung verlangsamt, die Komplikationen einer Leberzirrhose reduziert und die transplantationsfreie Überlebenszeit um bis zu vier Jahre verlängert.<sup>61-63</sup> UDCA ist das einzige Medikament, das derzeit zur Behandlung von Patienten mit PBC zugelassen ist. Über anticholestatische Effekte wurde aber auch bei einigen anderen cholestatischen Syndromen berichtet.<sup>60</sup>

## 1.2.2 Zusammensetzung der Galle

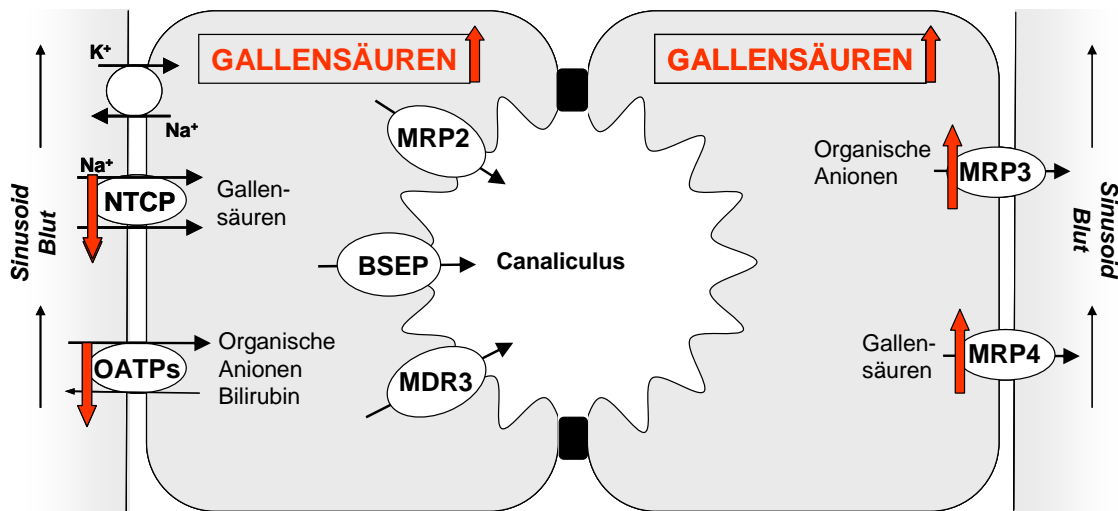
Die in der Leber gebildete Galle ist eine pigmentreiche, isotone Flüssigkeit mit einer Elektrolytzusammensetzung, die der des Blutplasmas ähnelt. Sie besteht zu 82 % aus Wasser. Gallensäuren bilden mit 67 % den Hauptanteil der in der Galle gelösten Substanzen. Weitere Bestandteile sind Phospholipide (22 %), Cholesterin (4 %), Proteine (4,5 %) und Bilirubin (0,3 %), das mit Glukoronsäure gekoppelt als konjugiertes Bilirubin sezerniert wird und der Galle die braungelbe Farbe verleiht.<sup>64</sup>

Man unterscheidet primäre, sekundäre und tertiäre Gallensäuren. Die primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert, mit Glycin (GCA, GCDCA) oder Taurin (TCA, TCDCA) konjugiert und in die Galle ausgeschieden. Diese Konjugation macht die primären Gallensäuren, die bei normalem pH in Wasser nur wenig löslich sind, über einen weiten pH- und Konzentrationsbereich sehr gut wasserlöslich, da sie als Anionen vorliegen. Deshalb werden sie auch als Gallensalze bezeichnet. In der normalen Galle beträgt der Quotient aus Glycin- und Taurinkonjugationen etwa 3:1.<sup>65</sup> Die sekundären Gallensäuren, einschließlich der Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA), werden als bakterielle Stoffwechselprodukte aus den primären Gallensäuren im Kolon gebildet. Lithocholsäure wird allerdings in deutlich geringerem Ausmaß im Kolon resorbiert als Deoxycholsäure. Tertiäre Gallensäuren sind Umwandlungsprodukte der sekundären Gallensäuren, die entweder im Darm oder nach deren Resorption in der Leber entstehen. Durch reduzierende Enzyme werden Ursodeoxycholsäure (UDCA) (vorzugsweise im Darm) und Sulfolithocholsäure (SLCA) (vorzugsweise in der Leber) gebildet.<sup>64</sup>

Gallensäuren sind Detergenzien, die oberhalb einer kritischen Konzentration in Wasser gelöst die als Mizellen bezeichneten molekularen Aggregate bilden. Diese bestehen aus dem alleine kaum wasserlöslichen Cholesterin, Phospholipiden, Lecithin und natürlich den Gallensäuren. Gallensäuren ermöglichen somit die biliäre Exkretion des Cholesterins. Außerdem sind Gallensäuren über einen mizellären Transportmechanismus für die normale intestinale Resorption der Nahrungsfette, in erster Linie Cholesterin und fettlösliche Vitamine, verantwortlich. Gallensäuren sorgen zusätzlich als eine entscheidende physiologische Kraft für den hepatischen Gallenfluss und unterstützen den Wasser- und Elektrolyttransport in Dün- und Dickdarm.<sup>64</sup>

## 1.2.3 Bildung und Sekretion der Galle

Eine Hauptfunktion der Leber ist die Produktion der Galle und die aktive, gerichtete (vektorielle) Sekretion von vielen endogenen und exogenen Substanzen aus dem portalen Blut in die Gallengänge.



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung der Gallensäuretransporter an der basolateralen und kanalikulären Membran von humanen Hepatozyten und ihre adaptive Antwort bei Cholestase.

Diese wird durch eine Gruppe von polarisierten Transportsystemen auf den sinusoidalen (basolateralen) und den kanalikulären (apikalen) Plasmamembrandomänen der Hepatozyten reguliert. Es sind zwei sinusoidale

Wiederaufnahmesysteme für Gallensalze bekannt, das Na<sup>+</sup>-abhängige Transportersystem „Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting“ (NTCP), sowie die Familie der Na<sup>+</sup>-unabhängigen Transporter, den sog. „anion-transporting polypeptides“ (OATPs). Während die NTCP den Hauptteil der Gallensäuren transportieren, bewerkstelligen die OATPs nicht nur die Aufnahme von Gallensäuren, sondern auch noch die einer Vielzahl anderer organischer Anionen und Medikamente. Der limitierende Prozess der Gallensekretion ist der aktive Transport an der kanalikulären Membran der Hepatozyten. Dieser wird bewerkstelligt von einer Reihe von ATP-abhängigen Exportpumpen, die auch als ABC-Transporter (ATP-binding-cassette-transport proteins) bezeichnet werden. Die Exkretion der monovalenten Gallensäuren erfolgt über eine sogenannte „bile salt export pump“ (BSEP, ABCB11), während die divalenten, konjugierten Gallensäuren, sowie die organischen Anionen (z. B. Bilirubin und Glutathion) über das „multidrug resistance associated protein 2“ (MRP2, ABCC2) sezerniert werden. Phospholipide werden über einen speziellen ABC-Transporter, den „multidrug resistance P-glycoprotein 3“ (MDR3, ABCB4), und Cholesterin über die beiden Hemitransporter ABCG5/G8 in die Galle ausgeschieden. Die Phospholipide sind notwendig, um aus den Gallensäuren und dem Cholesterin gemischte Mizellen zu bilden.<sup>57,66-68</sup> Um zu verhindern, dass es zu einer Akkumulation von potentiell toxischen Bestandteilen der Galle in den Leberzellen kommt, die zu Cholestase, Apoptose von Hepatozyten und zu Gewebeuntergang führt, gibt es adaptive Regulationsprozesse. Die transkriptionelle Herunterregulierung von NTCP und OATPs bei Cholestase führt zu einer verminderten Aufnahme von Gallensäuren und anderen organischen Anionen in die Hepatozyten und schützt diese somit vor einer Überladung mit Gallensäuren und Bilirubin.<sup>66,69</sup> Zur Kompensation des unter Cholestase stark herunterregulierten MRP2 an der apikalen Membran wird das Effluxsystem an der basolateralen Membran hochreguliert.<sup>66,70-72</sup> Dieses setzt sich zusammen aus den unter physiologischen Verhältnissen nur schwach exprimierten Transportern MRP3 (ABCC3) und MRP4 (ABCC4). Diese werden bei Cholestase hochreguliert und transportieren die angestauten toxischen Substanzen aus den Hepatozyten zurück ins Blut. Während MRP4 Gallensäuren zusammen mit Glutathion transportiert, befördert MRP3 konjugiertes Bilirubin und andere organischen Anionen wieder aus der Leberzelle heraus.<sup>57</sup> Des Weiteren wird unter Cholestase durch die Gallensäuren die Expression der Gallensalz-exportierenden-Pumpe BSEP

hochreguliert, womit die Sekretion der Gallensäuren in die Galle verstärkt wird, um die Zelle vor der Akkumulation toxischer Substanzen zu schützen. Die Regulation dieser adaptiven Prozesse erfolgt über die Aktivierung von nukleären Rezeptoren durch die Bindung von Gallensäuren. Die Rezeptoren aktivieren entscheidende Transkriptionsfaktoren, die an sogenannte „bile acid responsive elements“ (BAREs) in der Regulatorregion der entsprechenden Gene der Gallensäuretransporter binden.<sup>66</sup>

## **1.2.4 Unterschiedliche Formen der Leberzellschädigungen bei Cholestase**

Der Anstieg von Gallensäuren und anderen potentiell toxischen cholephilen Substanzen in Hepatozyten bei Patienten mit Cholestase führt zum Tod der Leberzelle. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Formen des Zelltods: Nekrose und Apoptose.<sup>10,13</sup> Der Begriff der Apoptose wurde bereits, in Kapitel 1.1, erläutert.

Unter Nekrose (v. griech. νέκρωσις „Tod, Absterben“) versteht man das passive Sterben einer Zelle in Folge irreparabler Schädigung, wie physikalische Verletzung oder Störung der Osmose. Apoptose und Nekrose lassen sich schon optisch leicht unterscheiden. Während bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle einsetzt, schwillt bei der Nekrose die Zelle an. Dabei wird die Plasmamembran zerstört und die Lysis der Zelle eingeleitet. Dadurch werden Stoffe aus dem Cytoplasma in den Extrazellularraum freigesetzt, die Makrophagen anlocken und damit eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Im Vergleich zur Nekrose ist die Apoptose die häufigere Form des Zelltods.<sup>10-13</sup>

In vitro verursachen hydrophobe Gallensäuren, wie GCDCA und TLCA bei Konzentrationen unter 100  $\mu\text{mol/L}$  typischerweise Apoptose, bei Konzentrationen darüber kann es sowohl zur Apoptose als auch zur Nekrose der Hepatozyten kommen.<sup>73</sup>

Da bei den meisten cholestatischen Lebererkrankungen keine ausgedehnte Nekrose zu finden ist, kamen Patel et al. zu dem Erkenntnis, dass für den Zelltod der Hepatozyten unter Cholestase wohl eher die Apoptose als die Nekrose eine Rolle spielt.<sup>74</sup> Zum

Beispiel wurden in Lebergewebeproben von PBC-Patienten viel häufiger Merkmale für Apoptose gefunden als in einer Kontrollgruppe.<sup>75</sup>

## **1.2.5 Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Apoptose in Hepatozyten**

Gallensäuren sind hydrophobe und potentiell zytotoxische Substanzen, deren Toxizität in physiologischen Konzentrationen durch die Konjugation mit Glycin oder Taurin gemindert wird.<sup>65</sup> Dennoch führen erhöhte Konzentrationen von Gallensäuren in den Hepatozyten zur Leberzellschädigung, zur Entwicklung einer Leberzirrhose und letzten Endes zum Leberversagen.<sup>76</sup>

Nicht alle Gallensäuren sind toxisch, und kleine Veränderungen in der Gallensäurenstruktur können die Zytotoxizität dramatisch verändern. So induziert die mit Glycin konjugierte Chenodesoxycholsäure (GCDCA) *in vitro* in Hepatozyten Apoptose, während die mit Taurin konjugierte Form (TCDCA) Überlebenssignale in der Leberzelle induziert und dadurch nicht zur Apoptose führt.<sup>77,78</sup> Die Anhäufung der hydrophoben, toxischen Gallensäuren in den Hepatozyten wird hauptverantwortlich gemacht für die Leberschädigung durch Cholestase. GCDCA ist die beim Menschen quantitativ bedeutendste hydrophobe Dihydroxygallensäure. Schmucker et al. zeigten, dass die Konzentration der toxischen Gallensäuren Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure in den Leberzellen mit dem Grad der Leberschädigung korreliert.<sup>79</sup>

Es wurde gezeigt, dass hydrophobe Gallensäuren *in vitro*<sup>78,80-82</sup> und *in vivo*<sup>83,84</sup> in Hepatozyten Apoptose induzieren.

Eine Möglichkeit, wie die bei Cholestase intrazellulär akkumulierten hydrophoben Gallensäuren Apoptose induzieren können, ist die direkte Aktivierung des mitochondrialen Wegs. Schoemaker et al. zeigten, dass GCDCA Caspase-8-Aktivierung und Apoptose in einer von FADD unabhängigen Weise induziert. Eine Inhibition von Caspase-8 hatte keinen Effekt auf die Aktivität der Caspase-3. Somit führten sie die Aktivierung der Caspase-8 auf postmitochondriale Mechanismen zurück.<sup>85</sup> In der Tat gibt es Hinweise für eine sekundäre Rekrutierung des extrinsischen Apoptosewegs nach vorausgehender Aktivierung der intrinsischen

Signalgebung. Ein Mediator könnte die Caspase-6 darstellen, die dann die Initiatorcaspase-8 aktiviert.<sup>86,87</sup>

Außerdem wurde gezeigt, dass physiologische Konzentrationen von Gallensäuren direkt die „mitochondrial permeability transition“ (MPT), die Bildung von „reactive oxygen species“ (ROS) durch die Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren können.<sup>88,89</sup> In zwei unterschiedlichen Rattenmodellen konnten oxidative Leberschäden bei Cholestase nachgewiesen werden.<sup>90-92</sup> Sokol et al. zeigten, dass hydrophoben Gallensäuren den normalen mitochondrialen Elektronentransport beeinträchtigen, indem sie die Aktivität der Elektronentransportkette I und II inhibieren und somit die ATP-Synthese reduzieren.<sup>90,93</sup> Die dadurch bedingte mitochondriale Dysfunktion führt zur Veränderung der Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran, die auch „mitochondrial permeability transition“ (MPT) genannt wird.

Durch die Bildung der reaktiven Sauerstoffmetabolite (ROS) kann die MPT getriggert werden. Sokol et al. zeigten auch, dass man mit Antioxidantien signifikant die durch GCDCA induzierte MPT und Bildung von Hydroperoxiden in isolierten Mitochondrien inhibieren kann.<sup>94</sup> Neben den Mitochondrien können die ROS auch im endoplasmatischen Retikulum gebildet werden.<sup>89,90,93,95-99</sup>

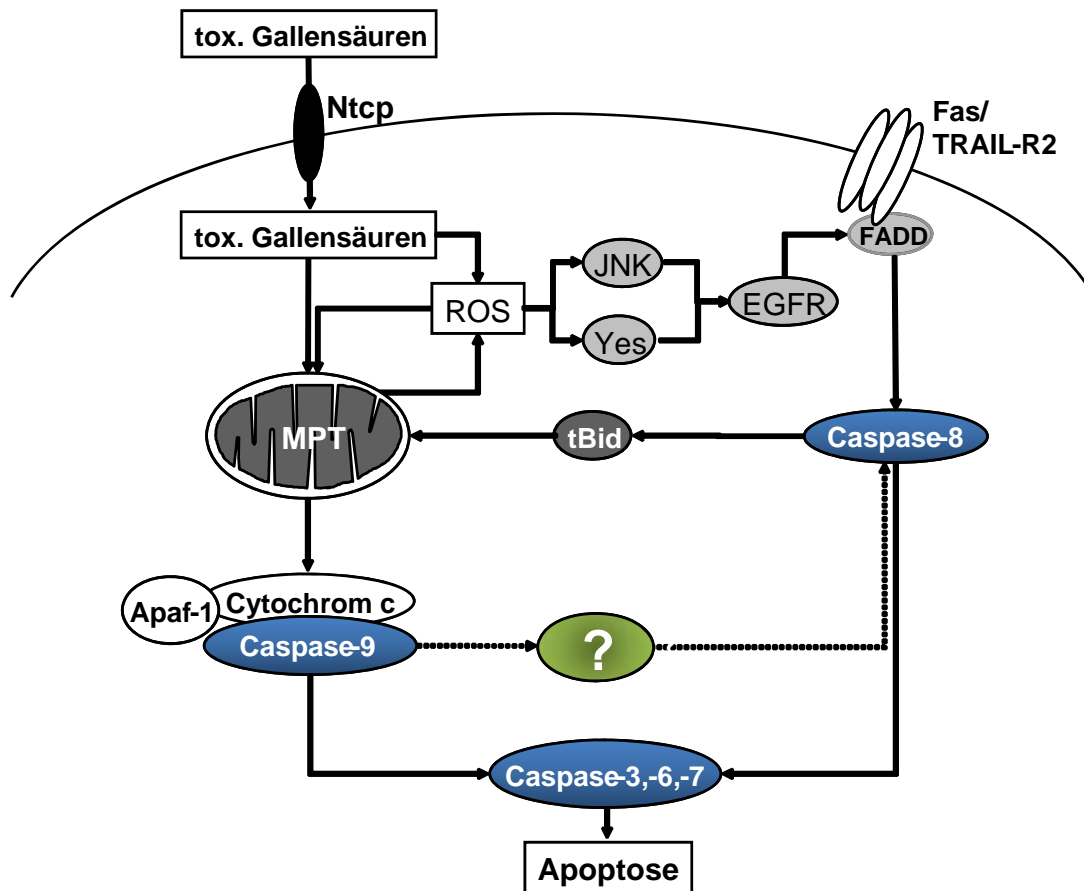
Auch durch die Hemmung der MPT kann die durch Gallensäuren induzierte Hepatozytenschädigung unterbunden werden.<sup>89,100</sup> Interessanterweise führt die gleichzeitige Stimulation mit einer toxischen, hydrophoben Gallensäure und der nichttoxischen, hydrophilen Ursodeoxycholsäure (UDCA) zu einer Reduktion der Apoptoserate in einer humanen Hepatozytenzelllinie. Der Grund hierfür ist vermutlich die Tatsache, dass UDCA die MPT reduziert.<sup>101</sup> Die darausfolgende Reduktion der Apoptose ist möglicherweise ein Grund für den positiven Einfluss der UDCA auf cholestatische Erkrankungen.

Hydrophobe Gallensäuren können außerdem auch unabhängig von Liganden über den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg in Hepatozyten Apoptose induzieren.<sup>80,81,102</sup> Studien in vitro und vivo haben gezeigt, dass toxische Gallensäuren zu einer ligandenunabhängigen Oligomerisierung von Fas, Rekrutierung von FADD und Aktivierung der Caspase-8 in Hepatozyten führen. Die Bedeutung dieses Signalweges

wurde dadurch verdeutlicht, dass in lpr-Mäusen, die nur eine minimale Menge von Fas exprimieren, die Apoptoserate bei Cholestase deutlich reduziert war.<sup>83</sup> Erhöhte Gallensäurenkonzentrationen in Hepatozyten führen zu einer Translokation von Fas von seiner intrazellulären Lokalisation an die Plasmamembran. Durch die Zunahme der Oberflächendichte der Membran an Fas-Rezeptoren kommt es dann zur Oligomerisierung des Rezeptors.<sup>82,98</sup>

Auch hierbei scheint die Induktion der „reactive oxygen species“ (ROS) durch die Gallensäuren von Bedeutung zu sein. Neueste Ergebnisse von Reinehr et al. zeigen, dass die Bildung von oxidativem Stress der ausschlaggebende Trigger für die Gallensäuren-induzierte Apoptosenkaskade ist.<sup>103</sup> Dabei werde ROS auch durch die „nicotinamide adenine dinucleotide phosphate“ (NADPH) Oxidase Isoformen gebildet.<sup>104</sup> Gallensäuren induzieren eine fast unmittelbare oxidative Stressantwort, die die Aktivierung der „c-Jun-N-terminal kinases“ (JNK) und die Aktivierung von Yes aus der Familie der Src-Kinase bewirkt. Diese ist wiederum verantwortlich für die Aktivierung des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR), der sich JNK-abhängig mit Fas/CD95 verbindet. Die daraus resultierende Phosphorylierung von Fas bewirkt die Translokation von Fas in die Plasmamembran, die Formation des DISC (death inducing signaling complex) und die Induktion der Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-8 und von Bid.<sup>103,104</sup> Studien mit Fas defizienten Zellen habe gezeigt, dass andere Todesrezeptoren, wie TRAIL-R2 (der auch „death rezeptor 5“, DR5 genannt wird) Fas funktional ersetzen können, wenn dieser fehlt.<sup>81</sup>

Untersuchungen von Schoemaker et al. zeigten, dass Apoptose bei BDL-induzierter Cholestase im Gegensatz zur Gallensäuren-induzierten Apoptose in vitro viel milder und nur zu einem frühen Zeitpunkt auftritt. Grund dafür ist, dass die Hepatozyten bei längerem Bestehen der cholestatischen Verhältnisse eine Resistenz gegenüber den toxischen Gallensäuren entwickeln, indem sie verstärkt antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 exprimieren.<sup>105,106</sup> Im Gegensatz zu Hepatozyten exprimieren Cholangiozyten, die im direkten und fortlaufenden Kontakt mit der Galle stehen, immer Bcl-2.<sup>107</sup> Neu synthetisiertes Bcl-2 wurde auch in den Hepatozyten von PBC-Patienten gefunden.<sup>75</sup>



**Abbildung 7. Schematische Darstellung der Gallensäuren-induzierten Apoptose in Hepatozyten.** Die Gallensäuren werden über den Natrium-Symporter Ntcp in die Zelle aufgenommen. 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 die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die toxischen Gallensäuren können die Generierung der ROS (reactive oxygen species) induzieren und die Zerstörung der Mitochondrienmembran herbeiführen. Inwiefern Caspase-8 auch 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; ein potentieller Kandidat ist die Caspase-6.



## 1.3 Steatosis hepatis

Der Ausdruck Steatosis hepatis beschreibt die Akkumulation von Fett in der Leber, die durch einen Fettanteil von mehr als 5 % des Gesamtgewichts der Leber und eine diffuse Ablagerung von Fettvakuolen (Triglyceriden) in mindestens der Hälfte aller Hepatozyten charakterisiert ist. Zu den Ursachen der Steatosis hepatis zählen Hyperalimentation, Alkoholmissbrauch, Medikamente, Toxine, Diabetes mellitus, Schwangerschaft und Eiweißmangel. Lassen sich neben der Fettablagerung auch Zeichen einer Entzündung nachweisen, spricht man von einer Fettleberhepatitis (Steatohepatitis).<sup>108-110</sup>

Als Ursache wird das Ungleichgewicht zwischen dem hepatischen Zufluss freier Fettsäuren (free fatty acids, FFAs), der Triglyceridsynthese und -exkretion gesehen.<sup>108,109</sup> Wenn Fett akkumuliert, werden die Lipide im Zytoplasma als Triglyceride (neutrale Lipide) gespeichert, es bildet sich eine mikro- oder makro-vesikuläre Steatosis und eine ballonartige Zelldegeneration aus.<sup>108,109</sup>

Hepatische Steatosis wurde lange Zeit hauptsächlich als ein Symptom der Alkoholkrankung gesehen. In den letzten Jahren wurde Steatosis immer häufiger ohne Alkoholabusus gefunden, was zu einer neuen Klassifizierung geführt hat. NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) bezeichnet eine einfache Fettleber, die über Jahre unbemerkt und symptomlos verlaufen kann. Die Prävalenz der NAFLD beträgt ca. 17 – 33 % der Bevölkerung. Wenn es gleichzeitig zur Entzündung der Leber kommt, spricht man von Steatohepatitis. Dabei unterscheidet man ebenfalls zwischen einer nicht-alkoholischen Fettleberentzündung (NASH, non-alcoholic steatohepatitis) und einer alkoholischen Fettleberentzündung (ASH, alcoholic steatohepatitis).<sup>109,110</sup>

### 1.3.1 Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)

Ludwig et al. beschrieben 1980 erstmals eine Serie von Patienten, deren Lebererkrankung sich histologisch trotz fehlenden Alkoholkonsums nicht von einer alkoholischen Hepatitis unterscheiden ließ.<sup>111</sup> Histologisch ist die NASH durch eine

lobuläre Hepatitis mit Anhäufung von Fettpartikeln gekennzeichnet. Sie kann bis zur Leberzirrhose fortschreiten.<sup>111,112</sup> Der Leberschaden bei Fettleber umfasst somit ein weites Spektrum von einer einfachen Steatosis, über Steatohepatitis bis hin zur fortgeschrittenen Fibrose und Zirrhose. Bei ca. 30–50 % aller Patienten mit NASH entwickelt sich eine Fibrose und bei ca. 1/6 aller Patienten eine Zirrhose.<sup>113,114</sup>

NASH wird am häufigsten in der 5. und 6. Lebensdekade beobachtet.<sup>112,115</sup> Die Erkrankung kommt bei Frauen wahrscheinlich etwas häufiger vor. Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer NASH sind ein metabolisches Syndrom mit Adipositas, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie sowie Medikamente (z. B. Amiodaron, Diltiazem, Kortikosteroide, Proteasehemmer, Tamoxifen). Goldstandard der Diagnostik ist die histologische Evaluierung einer Leberbiopsie.<sup>112,116,117</sup> Powell und Mitarbeiter haben folgende Kriterien zur Definition einer NASH vorgeschlagen:

(1) Histologische Veränderungen bestehend aus stärkerer, makrovesikulärer, fettiger Degeneration mit Entzündung (lobulär oder portal) mit oder ohne Mallory-Körperchen,

Fibrose und/oder Zirrhose.

(2) Wenig Alkoholkonsum (< 40 g Alkohol/Woche) basierend auf exakter Fremdanamnese. Idealerweise sollten wiederholte Negativresultate für Karbohydratdefizientes Transferrin (CDT) vorliegen.

(3) Ausschluß einer chronisch-viralen Hepatitis (B, C) bzw. anderer chronischer Lebererkrankungen.<sup>117</sup>

## 1.3.2 Pathogenese und Therapie

Steatose resultiert aus einer Kombination von Adipositas, Bewegungsmangel, genetischen und diätetischen Faktoren, die zu peripherer Insulinresistenz führen. Unklar ist, wie es von einer einfachen Steatose, die von Hepatozyten im Normalfall gut toleriert wird, zu einem schwerwiegenden Leberschaden, wie einer NASH, Fibrose oder sogar Zirrhose kommt. 1998 wurde ein „two hit“-Modell der Pathogenese der progressiven NAFLD postuliert.<sup>118</sup>

Den ersten Hit stellt die Entwicklung einer Steatose dar. Der zweite Hit induziert die Schädigung der Zellen, die Entzündungsreaktion und die Hepatitis-Komponente der Steatohepatitis, die schließlich zur Fibrose und Zirrhose der Leber führt.<sup>119,120</sup>

In der heutigen Vorstellung geht man von einem „multi-hit“-Modell aus, in dem unterschiedliche Faktoren, wie Insulinresistenz, Oxidativer Stress, Apoptose und Adipokine zur Progression der NAFLD beitragen können. Ausgangspunkt dabei ist die Entstehung einer Steatosis hepatis durch eine verminderte Oxidation freier Fettsäuren in der Leber, durch eine gesteigerte hepatische Fettsäuresynthese und/oder durch einen eingeschränkten Lipidexport aus der Leber. Mitverantwortlich für das vermehrte Vorkommen freier Fettsäuren in der Leber ist die Insulinresistenz und der dadurch bedingte Hyperinsulinismus. Die daraus resultierende Steatose verstärkt wiederum die Insulinresistenz und induziert schließlich einen circulus vitiosus.<sup>121</sup> In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei NASH-Patienten vermehrt frei zirkulierende Fettsäuren vorkommen, die mit der Schwere der Erkrankung korrelieren.<sup>122</sup> Die Leber ist somit vermehrt gegenüber freien Fettsäuren (FFS) exponiert und die vorliegende Hyperinsulinämie fördert wiederum die Fettakkumulation in der Leber.<sup>122</sup>

Neben der direkten toxischen Wirkung der freien Fettsäuren werden andere Faktoren diskutiert, die bei bestehender Steatosis hepatis eine Entzündung und Fibrose in der Leber induzieren. Verantwortlich dafür sind vermutlich eine mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress/Sauerstoffradikale (SR) und die damit verbundene Lipidoxidation oder eine vermehrte Expression von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ .<sup>118</sup> Oxidativer Stress führt in der verfetteten Leber zur Lipidoxidation, wodurch es zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) kommt. Dadurch kommt es zur gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie dem TNF- $\alpha$ , Interleukin-8 und Triggern der Fibrogenese.<sup>123-125</sup> Außerdem scheinen die zuletzt entdeckten Adipokine (Zytokine, die primär aus dem Fettgewebe stammen), wie Leptin und Adiponectin eine wichtige Rolle zu spielen. Adiponectin gilt als direkter Gegenspieler von TNF- $\alpha$  und wird bei Diabetes mellitus und Insulinresistenz (IR) vermindert produziert. Es wurde gezeigt, dass Adiponectin im Tiermodell sowohl alkoholische als auch nicht-alkoholische Steatohepatitis inhibieren kann.<sup>126</sup>

Die Pathogenese der NASH wurde bereits in zahlreichen Tiermodellen untersucht. Zu diesen Studien wurden vor allem ob/ob-Mäuse und fa/fa-Ratten herangezogen.<sup>127-129</sup>

Bei den ob/ob-Mäusen kommt es durch eine Spontanmutation zu einer verminderten Produktion des appetithemmenden Zytokin Leptin.<sup>127</sup> Bei den fa/fa-Ratten ist durch eine Spontanmutation der für Leptin notwendige Leptinrezeptor inaktiviert.<sup>128</sup> Sowohl ob/ob-Mäuse als auch fa/fa-Ratten entwickeln eine IR, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und eine Fettleber. Allerdings tritt in der Leber dieser Tiere keine wesentliche Hepatitis auf, solange nicht eine weitere Noxe hinzukommt.<sup>127-129</sup>

Auch Apoptose soll eine wichtige Rolle bei der Progression der zunächst harmlosen hepatischen Steatose zu einer chronischen Leberkrankheit spielen.<sup>119,120</sup> In Lebergewebeproben von NASH-Patienten konnte eine erhöhte Apoptoserate der Hepatozyten nachgewiesen werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen Gallensäuren-induzierter Apoptose und der Entwicklung eines Leberschadens, basierend auf einer Steatosis hepatis, untersucht.<sup>119</sup>

Für die Behandlung der NASH existiert keine etablierte Therapie. Da die Erkrankung Folge eines westlichen Lebensstils ist, sollten therapeutische Ansätze präventive Maßnahmen und Änderungen der Lebensgewohnheiten beinhalten. So wurden ob/ob-Mäuse mit Metformin, einem insulinsensitivierenden Medikament, behandelt. Dabei zeigte sich, dass diese Therapie zu einer Besserung der Steatohepatitis, der Hepatomegalie und zu einer Normalisierung der Transaminasen führte. Interessanterweise konnten die Autoren zeigen, daß diese Effekte über eine TNF- $\alpha$ -Hemmung durch Metformin bedingt waren.<sup>130,131</sup>

## 1.4 Fragestellung der Arbeit

### **Welche Bedeutung hat Caspase-6 für die Gallensäuren-induzierte Apoptose in HepG2 Zellen?**

Hydrophobe Gallensäuren lösen nach Aufnahme in die Hepatozyten Apoptose aus. Der molekulare Mechanismus der Induktion wird kontrovers diskutiert. Unklar ist die Bedeutung der Caspase-6 für die Gallensäuren-induzierten Caspasenkaskade. Caspase-6 könnte eine Verbindung zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Reaktionsweg darstellen und die postmitochondriale Aktivierung der Caspase-8 induzieren.

Zur Klärung dieser Frage wurde Caspase-6 oder -9 pharmakologisch oder mit Hilfe von siRNAs inhibiert und unter diesen Bedingungen die Aktivitäten der übrigen Caspasen untersucht.

### **Erhöht Steatose die Empfindlichkeit von Hepatozyten gegenüber Gallensäuren-induzierter Apoptose?**

Die Akkumulation von Lipiden in Hepatozyten ist ein pathologisches Merkmal einiger chronischer Lebererkrankungen, wie z. B. der NASH. Unklar ist allerdings, warum es in einigen Fällen zu einer Progression der eigentlich ungefährlichen Fettleber zu einer chronischen Leberschädigung kommt. Oxidativer Stress und Apoptose werden seit längerem als mögliche „hits“ diskutiert, die zu der Progression beitragen könnten.<sup>118</sup> Hydrophobe Gallensäuren können nachweislich sowohl oxidativen Stress, als auch Apoptose in Hepatozyten induzieren.

Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst ein Zellkulturmodell zur Untersuchung der Gallensäuren-induzierten Apoptose bei Steatose entwickelt. Mit Hilfe dieses Modells wurde untersucht, ob die Empfindlichkeit von Hepatozyten gegenüber Gallensäuren-induzierter Apoptose durch Steatose gesteigert wird.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinie

In dieser Arbeit wurde die humane Leberkarzinomzelllinie HepG2 (ATCC HB-8065) verwendet, die unser Labor von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) bezog. Diese wurde stabil mit pcDNA3.1-Ntcp transfiziert (s. 2.2.2).

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

- Blocking-Puffer: 5 % Milch o. BSA ad TBST
- ECL-Lösung (1): 0,1 M Tris; pH 8,5; 2,5 mM Luminol ; 0,4 mM p-Hydroxyzimtsäure
- ECL-Lösung (2): 0,1 M Tris pH 8,5; 6 mM Wasserstoffperoxid
- Hanks A Buffer: 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl. 0.4 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 0.5 mmol/L EGTA, 0.1 % D-Glucose; 37 °C; pH 7.4
- Hanks B Buffer: 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl. 0.4 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 0.4 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 3 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 % D-Glucose; 37 °C; pH 7.4
- Lysepuffer: 20 mM Tris-HCL, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 % Triton-X 100; 2 mM EDTA; Complete; 0,1 mM  $\text{NaVO}_3$ ; 10 mM NaF
- Paraformaldehyd: 3 % PFA ad PBS
- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl 6,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 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)  $\beta$ -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 %  $\beta$ -Mercaptoethanol
  - TBST: 20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
  - Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol
  - Trypsin/EDTA-1x-Lösung: 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, 0,85 g/l NaCl, pH 7-7,5

### 2.1.3 Antikörper

Monoklonaler Maus-Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (clone AC-15) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen); polyklonale Hase-Anti-cleaved-Caspase-3,-6,-9-Antikörper von Cell Signaling (Beverly, MA, USA); polyklonaler Maus-Anti-cleaved Caspase-7-Antikörper von Cell Signaling (Beverly, MA, USA); polyklonale Hase-Anti-Caspase-6,-9-Antikörper von Cell Signaling (Beverly, MA, USA); polyklonaler Maus-Anti-cleaved-Caspase-8-Antikörper von Prof. Krammer (DKFZ, Heidelberg); monoklonaler Maus-Anti-Cytochrom-c-Antikörper von BD Pharmingen (Heidelberg); Ziege-Anti-Hase-HRP-Antikörper von Bio-Rad (München); Ziege-Anti-Maus-HRP-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### 2.1.4 Sonstige Materialien, Chemikalien und Biochemikalien

Hyperfilm ECL von Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK); PVDF-Membran (0,45  $\mu$ m Porengröße) und Sterilfilter von Millipore (Bedford, USA); 40 % Acrylamide/Bis Solution 29:1 (3,3 % C), Protein Assay Farbstoff-Konzentrat und Protein-Marker für SDS-PAA-Gele von Bio-Rad (München); Antibiotic-Antimycotic-Mix (100x), Geneticin (G418), L-Glutamin (100x), Natriumpyruvat (100x), nicht-essentielle Aminosäuren, OPTIMEM, Oligofectamin-Transfektionsreagenz, Höchst-Farbstoff und Nilrot von Gibco/Invitrogen (Kalsruhe); Earle's MEM, DMEM, Williams E Medium, Fötale Kälberserum (FCS), PBS, Glutamin und Trypsin/EDTA (1x) von PAA

(Pasching, Österreich); siGENOME SMARTpool Caspase-6 und -9 und siCONTROL Non-Targeting von Dharmacon (Lafayette, CO, USA); Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Substrat und Puffer von Promega (Madison, WI, USA); TNF- $\alpha$  von Biosource (Camarillo, CA, USA); Actinomycin D, Etoposide, Glycochenodesoxycholsäure, Taurochenodesoxycholsäure, Trypan Blau, Dexamethason, Ölsäure, Palmitinsäure und Insulin von Sigma-Aldrich (Taufkirchen); Natrium-Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>) von der Firma Merial GmbH (Halbergmoos); Complete und Fugene-Reagenz von der Firma Roche (Mannheim); Acrylamid/N'N'-Methylen-Bis-Acrylamid (Biorad, Hercules, USA); Vectashield Mounting Medium von der Firma Vector (Burlingame, USA) alle anderen Reagenzien stammen von AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt).

Das verwendete Wasser wurde über eine Filteranlage der Firma Millipore (Bredford, USA) entionisiert und wird im Folgenden als ddH<sub>2</sub>O bezeichnet.



### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Isolation und Kultivierung von primären Rattenhepatozyten

Männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von  $217 \pm 32$  g wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Sie befanden sich bis zum Beginn der Experimente in Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einem 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Freier Zugang zu Nahrung und Wasser war gewährleistet.

Nach Anästhesierung der Ratten mittels intraperitonealer Injektion von  $50\text{ mg/kg}$  Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>) wurde die Bauchdecke geöffnet. Danach wurde in die Vena portae und die Vena cava inferior eine Kanüle eingeführt und die Vena cava inferior wurde oberhalb des Zuflusses der rechten Vena renales ligiert.

Anschließend wurden die Rattenleber mit präoxygeniertem ( $95\text{ \% O}_2$ ,  $5\text{ \% CO}_2$ ) Hanks A Puffer für 10 Min perfundiert. Die Perfusion wurde mit präoxygeniertem Hanks B Puffer und  $20\text{-}25\text{ mg/dL}$  zugesetzter Kollagenase fortgesetzt. Nach zweiminütiger Perfusion wurde auf Zirkulationsmodus umgestellt, bis einzelne Zellen im Perfusat erkennbar waren. Danach wurde die Leber in eisgekühlten Hanks B Puffer gegeben. Die Leberkapsel wurde eröffnet und die Zellen vom Bindegewebe entfernt. Die Zellsuspension wurde durch ein  $80\text{ }\mu\text{m}$  Netz filtriert und in ein Zentrifugengefäß transferiert. Die Zellen wurden mit Hanks B Buffer gewaschen und mittels Percoll<sup>®</sup> Gradienten Zentrifugation weiter gereinigt. Der die abgestorbenen Zellen enthaltende Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in supplementiertem Williams E Medium (Williams E Medium,  $10\text{ \%}$  fetalen Kälberserum,  $15\text{ mmol/L}$  HEPES,  $2\text{ mmol/L}$  Glutamin,  $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$  Insulin,  $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$  Dexamethason,  $10\text{ kU/L}$  Penicillin,  $10\text{ mg/L}$  Streptomycin, und  $25\text{ }\mu\text{g/L}$  Amphotericin B (Antibiotic-Antimycotic-Mix)) suspendiert. Nach Trypanblau-Färbung lag der Anteil lebender Zellen im Mittel bei  $89\text{ \%}$ . In zuvor mit Kollagen beschichteten 96-Well-Platten wurden pro Vertiefung  $50.000$  Zellen in je  $100\text{ }\mu\text{l}$  supplementiertem Williams E Medium ausgesät. Nach 4-stündiger Inkubation wurden die Zellen dann verfettet (s. 2.2.10)

### 2.2.2 Kultivierung von HepG2-Ntcp Zellen

HepG2-Ntcp Zellen (ATCC HB-8065) wurden in supplementiertem MEM (minimal essential medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 % nichtessentielle Aminosäuren, 4nM L-Glutamin (100x), 1 mM Natriumpyruvat und 50 mg/ml Geneticin G418, pH 7,4, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) angezchtet.

Ein Mediumwechsel erfolgte 2x pro Woche, 1x pro Woche wurde eine Zellpassage mit Trypsin/EDTA-1x-Lösung durchgeführt.

Eine ca. 90 prozentige Konfluenz der Zellen wurde am zweiten Tag nach der Zellpassage erreicht und diente als Ausgangspunkt für die meisten Versuche.

### 2.2.3 Stabile Transfektion der humanen HepG2 Zellen mit einem pcDNA

#### 3.1/Ntcp-Plasmid

Zur stabilen Transfektion mit Ratten-Ntcp wurden die HepG2 Zellen auf 6-Well-Gewebekulturplatten aufgetragen. Nachdem die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % des Plattenbodens gewachsen waren, wurden sie mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt transfiziert. Das transfizierte Plasmid enthielt neben dem Gallensäuretransporter Ntcp auch ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geneticin, sodass nach Kultivierung der Zellen in entsprechendem Antibiotikum eine Auslese zugunsten der erfolgreich transfizierten Zellen ermöglicht wurde.

**Transfektion:** Das Kulturmedium in den Vertiefungen wurde durch je 2 ml serumfreies komplettes Medium ersetzt.

Herstellung des Transfektionsgemisches: 100 µl Optimem + 5 µl Fugene-Reagens 10 min bei RT inkubiert, dann Zugabe von 2 µg der Plasmid-cDNA und weitere 20 min Inkubation bei RT.

100 µl des Transfektionsgemisches wurden in jede Vertiefungen pipettiert. Nach 4-8 h erfolgte die Zugabe von 10 % FCS und Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut nach Zugabe von 500 µl/Vertiefung 1x Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das gleiche Volumen an MEM zur Neutralisation zugegeben.

Die Zellen wurden in 10 cm Petrischalen ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 1 mg Geneticin (G418) und eine Anzucht für 14-21 Tage, bis Monoklonen sichtbar waren.

Einzelne Klone wurden unter Zuhilfenahme steriler Klonzylinder (Scienceware, Pequannock, NJ, USA) abtrypsiniert, die Lösung wurde anschließend mit gleichem Volumen MEM neutralisiert.

Isolierte Klone wurden in je einer Vertiefung einer 24 Well-Platte ausgesät und mit 1 ml MEM und 1 mg/ml Geneticin (G418) kultiviert. Dadurch wurde eine kontinuierliche Selektion zu Gunsten der effizient transfizierten HepG2 Zellen erreicht.

Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen abtrypsiniert, abzentrifugiert und nach Resuspension des Rückstandes in Einfrierlösung (90 % FCS, 10 % DMSO) tiefgefroren.

### **2.2.4 Transiente Transfektion von RNA-Oligonukleotiden in HepG2-Ntcp Zellen**

Konfluente HepG2-Ntcp Zellen wurden nach Trypsinierung in einer Dichte von 100.000 Zellen/Well im 12-Well-Format in MEM mit Zusätzen, aber ohne Antibiotika ausgesät. Die Transfektion erfolgte 24 h später. Dazu verwendeten wir immer MEM mit Zusätzen, jedoch ohne FCS und Antibiotika. Zunächst wurde pro Ansatz 2 µl Oligofectamin mit 8 µl OPTIMEM 5-10 min in einem Eppendorfröhrchen inkubiert. In einem weiteren Röhrchen wurde 1,25 µl der jeweiligen siRNA (20 µM) mit 88,75 µl MEM vermischt. Dann wurden die Inhalte beider Röhrchen vorsichtig miteinander vermengt und 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurden die Wells einmal mit MEM gewaschen und anschließend 400 µl MEM auf jedes Well gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde 100 µl des Ansatzes in jedes Well gegeben. Vier Stunden später wurde 250 µl MEM/Well mit 30 % FCS zugegeben, um den FCS Gehalt im Kulturmedium wieder auf 10 % anzuheben. Nach 24 h wurden die Zellen durch 1x Trypsin-EDTA abgelöst und wieder neu ausgesät.

### 2.2.5 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die Zellen wurden nach einmaligem Spülen mit 1xPBS mit einem Gummischaber vorsichtig von der Kulturgefäßoberfläche entfernt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 Min bei 350 x g zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet mit dem etwa 5fachen Volumen an Lysepuffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert, circa 10 sec sonifiziert und für 5 min bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Gesamtzelllysate, das sich im Überstand befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, das aus Zelltrümmern und Membranfragmenten bestand, wurde verworfen. Die Lysate wurden sofort weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BioRad Protein Microassay der Firma BioRad (München). Dazu wurden 1 µl Zelllysate 1:800 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend versetzten wir die Proteinverdünnungen mit 200 µl des Protein Assay Farbstoff-Konzentrat von BioRad. Nach 10 min Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen erfolgte durch den Vergleich mit den Standardverdünnungen.

### 2.2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

SDS-PAGE (Abkürzung für *engl.* sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) benutzten wir, um die Proteine der Größe nach aufzutrennen und zu analysieren. Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid geladen.

Zunächst wurde das Trenngel/Sammelgel angesetzt, bestehend aus 40 %igem (w/v) Acrylamid/N'N'-Methylen-Bis-Acrylamid, Trenngelpuffer/ Sammelgelpuffer, ddH<sub>2</sub>O und SDS. Je nach Molekulargewicht des aufzutrennenden Proteins variierte die Menge an eingesetztem Acrylamid. In der Regel benutzten wir 8 %ige bis 15 %ige Trenngele,

während die Sammelgele nur 4 oder 5 %ig waren. Nach 15 min Entgasen wurde zunächst zum Trenngel APS und TEMED dazugegeben, alles vorsichtig gemischt, zwischen 2 Glasscheiben gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 45 min) wurde das Isopropanol abgegossen und die Oberfläche mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Nach Zugabe von APS und TEMED zum Sammelgel, wurde dieses ca. 1 cm auf das schon polymerisierte Trenngel gegossen und ein Kamm hineingesteckt, damit sich die späteren Probenauftragstaschen bilden konnten. Nach der vollständigen Polymerisation wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen, das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer (Bio-Rad) eingebaut und die Kammer mit SDS-haltigem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 2xSDS-Probepuffer versetzt und für 5 Min bei 95°C aufgeköcht. Dann wurden sie in die Probenauftragstaschen pipettiert. Die durch das SDS denaturierten und stark negativ geladenen Proteine wanderten nach dem Anlegen einer Spannung von 150 V zur Anode, wobei sie zunächst in dem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und dann in dem höherprozentigen Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt wurden.

### 2.2.8 Western-Blot

Western Blot (syn: Immunoblot) bezeichnet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran. Die Proteine können anschließend über spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Vor dem eigentlichen Western Blot wurde ein Proteingemisch mit Hilfe der SDS-Page entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderen Eigenschaften aufgetrennt (siehe 2.2.6). Anschließend wurden die Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid)) transferiert. Die PVDF-Membran wurde zuvor auf die Größe des Gels zugeschnitten, 15 sec in Methanol, 2 min in ddH<sub>2</sub>O und dann für mehrere Minuten in den Transferpuffer gelegt. Die Übertragung erfolgte in einer Tank-Transferkammer der Firma Bio-Rad. Dabei folgte 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, wanderten die Proteine von der Kathode zur Anode, d. h. sie verließen das Gel und wurden auf die Membran transferiert. Auf Grund der hydrophoben Wechselwirkungen blieben die

Proteine an der Membranoberfläche haften und das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran mussten zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Dafür wurde die Membran für mindest. 60 Min in einer Lösung von 5 % (w/v) Magermilch bzw. BSA (bovine serum albumin) in TBS-T leicht bei RT geschüttelt. Mit spezifischen Antikörpern konnten wir nun die Proteinbanden auf der Membran identifizieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in einer geeigneten Verdünnung mit 5 % (w/v) Magermilch bzw. BSA in TBS-T bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran mindestens dreimal für je 5 Min in TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper wieder zu entfernen. Danach wurde sie mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten Sekundärantikörper für 60 Min bei RT hybridisiert. Dieser sekundäre, HRP („horseradish peroxidase“)-gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls mit 5 % (w/v) Magermilch bzw. BSA in einer geeigneten Verdünnung eingesetzt. Hinterher wurde dreimal mit TBS-T gewaschen. Dann wurde die Membran für 1 min mit 10 ml der ECL-Lösung (Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1) inkubiert, mit Folie überzogen, im Dunkelraum in einer Entwicklungskassette für verschiedene Zeitintervalle (15 sec bis 30 min) belichtet und die Filme nachfolgend in der Entwicklermaschine entwickelt.

Um auf der gleichen Membran noch weitere Proteine zu untersuchen, mussten wir die hybridisierten Antikörper von der Membran ablösen, was auch als „Stripping“ bezeichnet wird. Dazu inkubierten wir die Membran mit 10 ml Stripping Puffer und 70 µl β-Mercaptoethanol für 10 min bei 60°C. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, 60 Min in 5 % (w/v) Milch bzw. BSA in TBS-T geblockt und dann mit dem für das Protein spezifischem Antikörper erneut hybridisiert.

### **2.2.9 Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7-Aktivitätsassay**

Zur Erfassung der Caspase-3/7-Aktivität als Indikator für Apoptose in unserem Zellmodell wurde ein kommerzieller Assay (Apo-ONE<sup>IT</sup> Homogeneous Caspase-3/7-Assay, Promega Corporation, Madison, WI, USA) verwendet.

Stabil mit dem Ntcp-Transporter transfizierte HepG2 Zellen wurden 24 h bis 72 h vor Durchführung des Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7-Assays (Promega) im 96-Well Format ausgesät. Pro Versuchsgruppe wurden stets drei verschiedene Vertiefungen

verwendet. Bei jedem Versuch wurde eine Reihe als Negativkontrolle (drei Vertiefungen, bei denen keine vorherige Stimulation der Zellen erfolgte) mitgeführt.

Die Stimulation erfolgte stets in 50 µl MEM ohne Zusätze. Nach der Stimulation wurden jeder Vertiefung 50 µl des Homogeneous Caspase-3/7-Testreagenz beigefügt. Dieses setzte sich zusammen aus dem (Z-DEVD)<sub>2</sub>-Rhodamin 110 Substrat, das 1:100 in dem Lysepuffer von Promega gelöst wurde. Nach Zugabe des Testreagenz wurden die 96-Well-Platten lichtgeschützt eingepackt und auf einem Plattenschüttler bei RT und einer Drehzahl von 300 - 500 rpm bis zum Ablesezeitpunkt durchgemischt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach 2 h in einem Fluorimeter (Zytoflour, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) bei einer Exzitationswellenlänge von 485±20 nm und einer Emissionswellenlänge von 530±25 nm. Die von uns gewertete Caspase-3/7-Aktivität entsprach dem Mittelwert der drei Einzelmessungen. Um mehrere Versuche vergleichen zu können, wurde die nicht stimulierte Negativkontrolle gleich 1 gesetzt.

**Theorie:** Der spezielle Lysepuffer permeabilisiert die Zellen, sodass die intrazellulären Stoffe in das Medium freigesetzt werden. Durch die freigesetzten aktivierten Caspasen-3 und -7 werden die DEVD-Peptide durch sequenzielle Spaltung entfernt und die Rhodamin 110-Gruppe beginnt unter gleichzeitiger Anregung bei 499 nm intensiv zu fluoreszieren. Das Emissionsmaximum liegt bei 521 nm. Die Menge der entstandenen fluoreszierenden Substanz ist proportional der Caspase-3/7-Aktivität in der Probe.

### 2.2.10 Verfettung von Zellen

Zur Verfettung von HepG2-Ntcp Zellen wurden diese für 24 Stunden mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren inkubiert. Die primären Rattenhepatozyten wurden nur für 12 Stunden mit den Fettsäuren inkubiert. Die in flüssiger Form erhältliche Ölsäure (18:1) wurde mit DMSO zu einer 300 mM-Stammlösung vorverdünnt. Die Palmitinsäure (16:0) wurde in DMSO gelöst um eine 200 mM-Stammlösung zu erhalten. Beide Fettsäuren wurden zur Verfettung der Zellen in Konzentrationen von 1 - 1000 µM eingesetzt. Zur Verfettung von HepG2-Ntcp Zellen verwendeten wir supplementiertes MEM (s. Kapitel 2.1.1), für die der primären Rattenhepatozyten DMEM. Zu beiden Medien gaben wir zur besseren Lösung der Fettsäuren 1 % Rinderserumalbumin (BSA).

### 2.2.11 Sudanfärbung

HepG2-Ntcp Zellen wurden auf Deckgläschen (Durchmesser: 25 mm, ca. 200.000 Zellen/Deckgläschen) ausgesät und für 24 Stunden verfettet (s. Kapitel 2.2.10). Danach wurden die Zellen dreimalig mit PBS (37°) gewaschen und bei 4 °C für 20 Min mit 4 % Paraformaldehyd inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen für 30 Sek in destilliertem Wasser wurde für 30 Sek 50 % Ethanol auf die Zellen gegeben. Gleich darauf wurden die Zellen für 3 Min mit Hämatoxylin angefärbt und danach für 1 Min in Leitungswasser gespült. Für 20 Sek wurde kurz 1 %ige Salzsäure auf die Zellen gegeben und die Deckgläschen wurden nochmals für weitere 5 Min in Leitungswasser gereinigt. Nach kurzer Inkubation der Zellen in 50 % Ethanol wurde das Fett in den Zellen durch 20-minütige Färbung der Zellen mit Sudanrot sichtbar gemacht. Anschließend erneutes 3-maliges Waschen der Zellen in destilliertem Wasser. Nach kurzem Antrocknen der Zellen wurden die Deckgläschen mit Glyceringelantine auf den Objektträgern fixiert.

### 2.2.12 Nilrot-Fluoreszenzmikroskopie

HepG2-Ntcp Zellen wurden auf Deckgläschen (Durchmesser: 25 mm, ca. 200.000 Zellen/Deckgläschen) ausgesät und für 24 (12) Stunden verfettet (s. Kapitel 2.2.10). Nach Inkubation wurden die Zellen zweimalig mit PBS (37°C) gewaschen. Danach wurden die Zellen bei 4 °C für 20 Min mit 3 %-igen Paraformaldehyd fixiert, anschließend dreimalig für je 5 Min mit TBST gespült und für 24 Stunden in TBST inkubiert. Zur Kernfärbung wurden die Zellen für 40 Min mit Höchst 3342 (1:200) inkubiert. Danach wurde für weitere 20 Min Nilrot dazugegeben um das Fett in den Zellen anzufärben. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimalig für je 30 Sek mit TBST gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Vectashield Mounting Medium (Vector H.100) auf einen Objektträger eingedeckt. Die Verfettung der Zellen konnten anschliessend mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.



### 2.2.13 Fettquantifizierung mittels Nilrot

HepG2-Ntcp Zellen wurden am Vortag im 96er-Wellformat ausgesät (10.000/Well). Die Zellen wurden für 24 (12) Stunden mit den Fettsäuren inkubiert (vgl. 2.2.10). Nach zweimaligen Waschen mit PBS (37 °C) wurde in jede Vertiefung 50 µl Nilrot-Lösung (1 mg/ml DMSO) gegeben und für 15 Min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimalig mit PBS gewaschen und 50 µl PBS auf den Zellen belassen. Anschliessend wurde das Nilrot-Fluoreszenzsignal mittels Fluorometrie bei einer Exzitation von 488 nm und einer Emission von 550 nm gemessen.

### 2.2.14 Statistik

Die Ergebnisse der Experimente wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden je nach Experiment mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test bzw. der Varianzanalyse für wiederholte Testung (ANOVA) und einem angeschlossenen Bonferroni-Test für multiple 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 Untersuchung der Gallensäuren-induzierten Apoptose im Modell der humanen Hepatomzelllinie HepG2

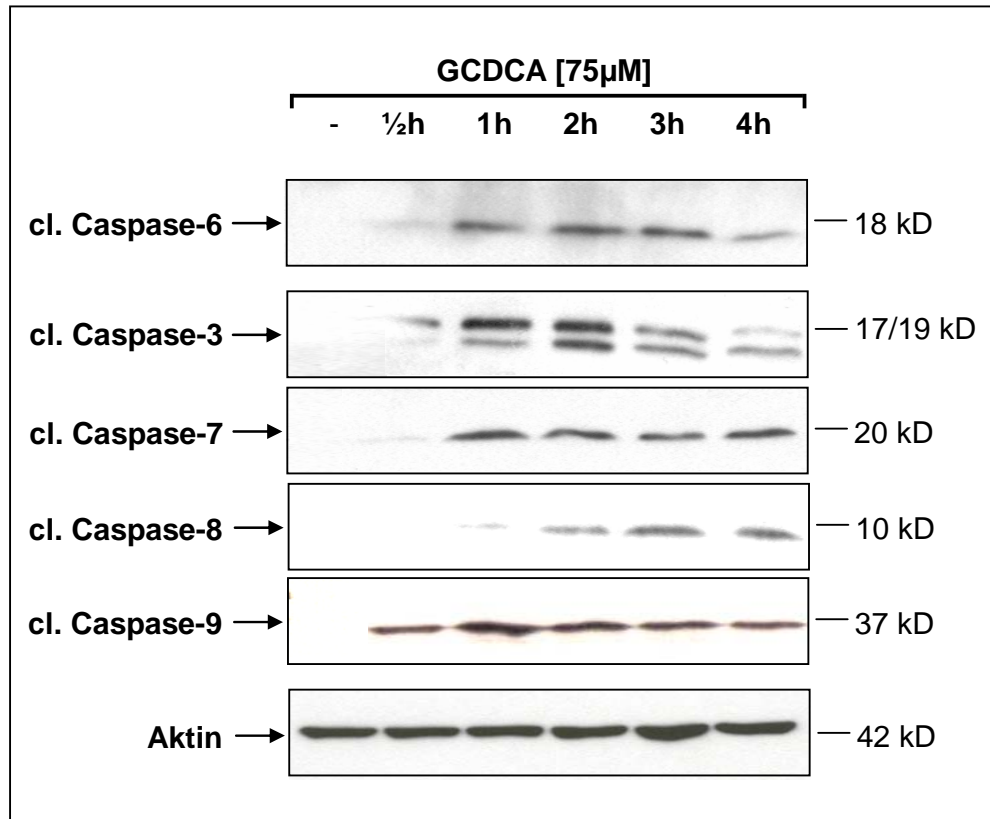
Eine humane HepG2-Hepatomzelllinie wurde stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert, da hydrophobe Gallensäuren erst nach Aufnahme in die Zellen Apoptose induzieren können. In nicht mit Ntcp transfizierten HepG2 Zellen haben die hydrophoben Gallensäuren keinen Einfluss auf die Apoptoserate der Leberzellen. Eine Aufnahme in die Leberzellen ist somit Voraussetzung für die toxische Wirkung von hydrophoben Gallensäuren wie GCDCA. In Ntcp-transfizierten HepG2-Ntcp Zellen kann GCDCA (75  $\mu\text{mol/L}$ ) in mikromolaren Konzentrationen effektiv Apoptose induzieren.<sup>132</sup> Apoptose wurde über Messung der Caspase-3/7-Aktivität mittels des fluoreszierenden Substrats Z-DEVD-R110 quantifiziert, bzw. im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die an Apoptose beteiligten Caspasen erfasst.

#### 3.1.1 Aktivierung der Caspase-3,-6,-7,-8 und -9 bei Stimulation mit GCDCA

Die hydrophobe Gallensäure GCDCA (75  $\mu\text{mol/L}$ ) induziert in HepG2-Ntcp Zellen nach  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 3 oder 4 Stunden die Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen. Am frühesten konnte eine halbe Stunde nach Stimulation die aktive Caspase-9 (cleaved Caspase-9) nachgewiesen werden. Die aktive, geschnittene Caspase-6 (cleaved Caspase-6) war ebenfalls bereits nach einer halben Stunde Inkubationszeit nachweisbar und erreichte ihr Expressionsmaximum nach zweistündiger Stimulation mit GCDCA. Im Vergleich dazu benötigte die aktive Form der Caspase-8 4 Stunden, bis sie ihr Maximum erreichte, und eine mindestens einstündige Stimulation mit GCDCA, bis sie überhaupt nachweisbar war (s. Abbildung 8).

Die Aktivierung der Caspase-8 erfolgte somit ca. 2 Stunden später als die der Caspase-6.

Die Effektorcaspasen-3 und -7 wurden ungefähr gleichzeitig mit Caspase-6 aktiviert.



**Abbildung 8.** Die aktive Form der Caspase-6 erreicht bereits nach zweistündiger Stimulation mit GCDCA ihr Expressionsmaximum. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit der hydrophoben Gallensäure GCDCA stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Der Western Blot mit primären Antikörpern gegen die aktivierten Caspasen-3,-6,-7,-8 und -9 zeigt die Zeiten, zu denen die Caspasen aktiv waren. Aktin diente als Ladungskontrolle.

### 3.1.2 Blockierung der Caspase-6 mit dem spezifischen Inhibitor Z-VEID-FMK

Der Inhibitor Z-VEID-FMK kann über die Aminosäuren Valin (V), Glutaminsäure (E), Isoleucin (I) und Asparaginsäure (D) direkt im katalytischen Zentrum der Caspase-6 binden. Die Fluoromethylketon-Gruppe (FMK) modifiziert die Thiol-Gruppen im katalytischen Zentrum, so dass die Caspase-6 irreversibel gehemmt wird. Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z) macht das Inhibitor-Molekül zellpermeabel.

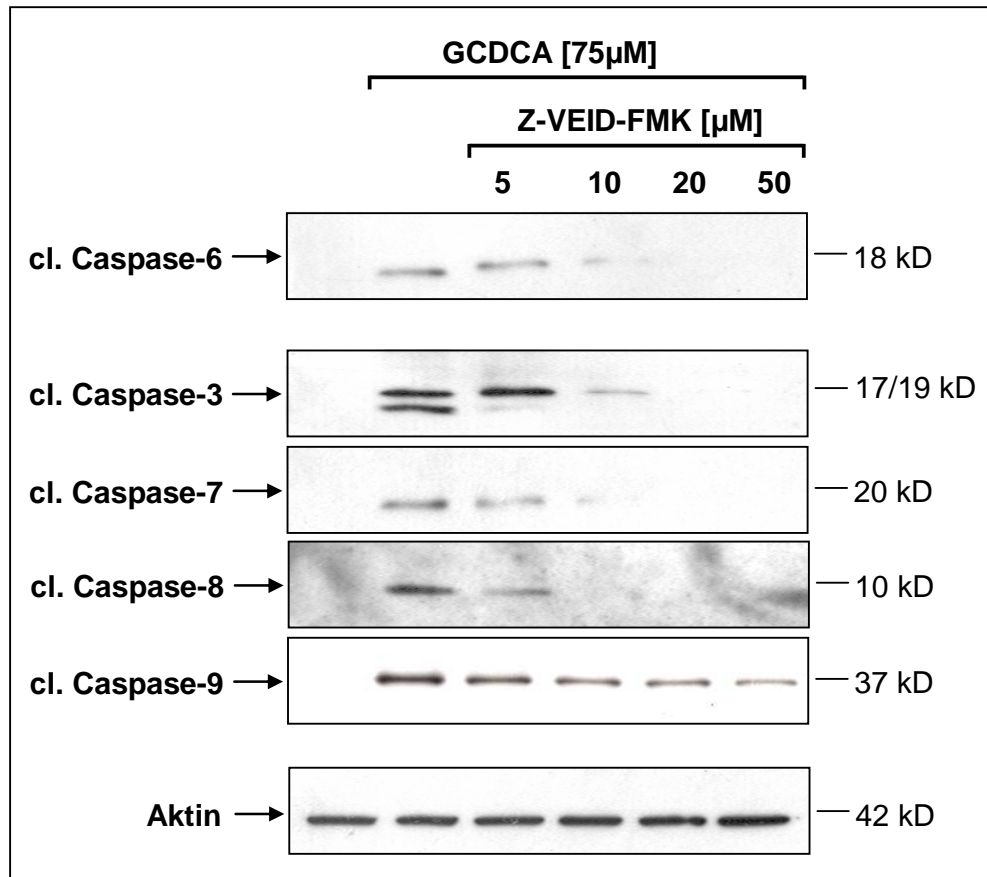
Die Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit 75 μM GCDCA für 2 Stunden zeigte verglichen mit unstimulierten Zellen eine deutliche Aktivierung der Caspasen-3,-6,-7,-8

und -9. Bei gleichzeitiger Zugabe des Caspase-6 spezifischen Inhibitors Z-VEID-FMK in Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$  konnten nur noch geringe Mengen aktiver Caspase-6 nachgewiesen werden. Konzentrationen über 10  $\mu\text{M}$  führten zur vollständigen Inhibierung der Caspase-6.

Die Inhibierung der Caspase-6 in den mit GCDCA stimulierten Zellen führte auch zur deutlichen Abnahme der aktiven Caspasen-3,-7, und -8 (s. Abbildung 9). Bei Caspase-3 verschwand zunächst durch Zugabe des Inhibitors Z-VEID-FMK nur die untere Bande der Doppelbande. Die obere Bande wurde erst bei einer Inhibitorkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  in ihrer Aktivität geschwächt. Beide Banden entsprechen der prozessierten, großen Untereinheit der Caspase-3. Die untere Bande (17 kDa) entsteht vor allem nach Proteolyse durch Caspase-8 oder -10 und Autoprozessierung.<sup>133</sup> Die obere Bande (19 kDa) repräsentiert die große Untereinheit der Caspase-3, die insbesondere nach Aktivierung durch andere Caspasen als Caspase-8 oder -10 entsteht.<sup>134</sup>

Caspase-9 wurde durch Zugabe des spezifischen Caspase-6 Inhibitors in ihrer Aktivität weniger stark beeinflusst als die Caspasen-3,-7 und -8. Aktive Caspase-9 war auch bei Inhibitorkonzentrationen über 20  $\mu\text{M}$  noch deutlich nachweisbar.

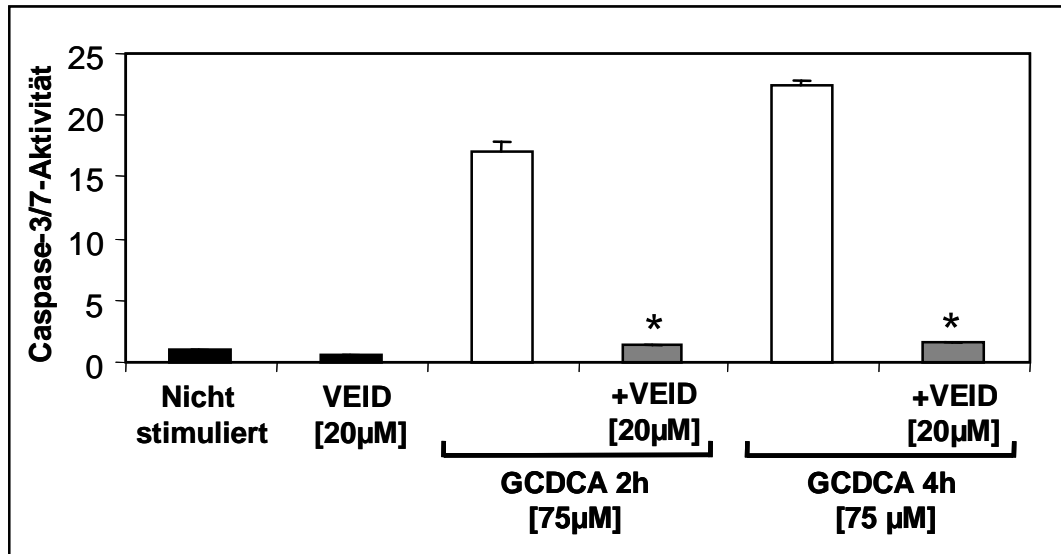
Die Inhibitorversuche gegen Caspase-6 zeigen, dass die Caspase-6 aktiviert werden muss, damit die durch Gallensäuren induzierte Caspasenkaskade ungestört ablaufen kann.



**Abbildung 9. Z-VEID-FMK (5-50 μM) inhibiert Caspase-6.** HepG2-Ntcp Zellen wurden 2 Stunden mit Trägermedium (Kontrolle), mit GCDCA (75μM) allein oder zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen Z-VEID-FMK (5 μM – 50μM) inkubiert. Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen aktivierte (cleaved) Caspase-6 (cl. Caspase-6), -3 (cl. Caspase-3), -7 (cl. Caspase-7), -8 (cl. Caspase-8) und -9 (cl. Caspase-9) zeigen die Aktivität der jeweiligen Caspase. Aktin diente als Ladungskontrolle.

Zu hohe Konzentrationen des Z-VEID-FMK (> 50 μM) können unspezifisch andere Caspasen hemmen. Deshalb sollte der Caspase-6-spezifische Inhibitor in der geringsten wirksamen Konzentration eingesetzt werden. Bei Z-VEID-FMK waren dies 20 μM, da bei niedrigen Konzentrationen (bis 10 μM) noch aktivierte Caspase-6 nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 9).

Die GCDCA-induzierte Apoptoserate wurde durch Zugabe von 20 μM des spezifischen Caspase-6-Inhibitors Z-VEID-FMK signifikant um mehr als 90 % reduziert (s. Abbildung 10).



**Abbildung 10.** Der spezifische Caspase-6-Inhibitor reduziert die GCDCA-induzierte Apoptose in HepG2-Ntcp Zellen. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit Trägermedium (Kontrolle), mit GCDCA (75µM) allein oder zusammen mit 20 µM Z-VEID-FMK für die angegebenen Zeiten (2 oder 4 h) 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 ± SD, n=3, \*p<0,05, vgl. 75 µM GCDCA).

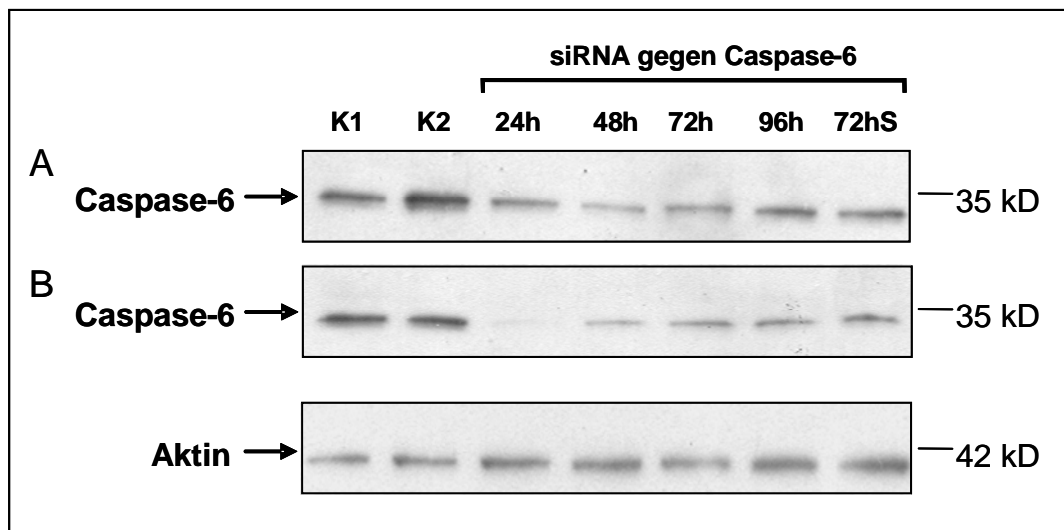
Aus Abbildung 9 und 10 ist ersichtlich, dass die Blockierung der Caspase-6 zu einer deutlichen Reduktion der Gallensäuren-induzierten Apoptose führte und die Caspasen-3, -7 und -8 nur noch geringfügig aktiviert wurden. Caspase-6 scheint somit für die Aktivierung der Caspasen-3, -7 und 8 von essentieller Bedeutung zu sein. Dies deutet darauf hin, dass bei GCDCA-induzierter Apoptose in HepG2 Zellen die Caspase-8 nicht über den extrinsischen Signalweg aktiviert wird, sondern über den mitochondrialen Signalweg, in dem auch die Caspase-6 involviert zu sein scheint.

### 3.1.3 Inhibierung der Caspase-6-Expression durch siRNA Transfektion

Caspase-6 kann in HepG2-Ntcp Zellen auch durch Transfektion mit synthetischen siRNAs auf mRNA und Proteinebene herunterreguliert werden. Diese siRNAs bestehen aus einer Mischung doppelsträngiger RNAs (dsRNA)-Moleküle mit vier unterschiedlichen Sequenzen und einer Länge von jeweils 21 Nukleotiden.

## 3.1.3.1 Zeitkinetik

Die Transfektion von HepG2-Ntcp Zellen mit siRNA gegen Caspase-6 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (20 nM und 50 nM) reduzierte den Caspase-6-Proteingehalt der Zellen bereits am ersten Tag nach Transfektion deutlich. Die Zeitkinetik zeigt, dass der endogene Caspase-6-Gehalt der Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit siRNA gegen Caspase-6 deutlich reduziert war und dieser Effekt hielt sich bis über 96 Stunden nach Transfektion. Selbst das Ablösen der Zellen mit Trypsin 24 Stunden nach der Transfektion und erneutes Aussäen beeinflusste die Effizienz der Reduktion nicht (s. Abbildung 11).

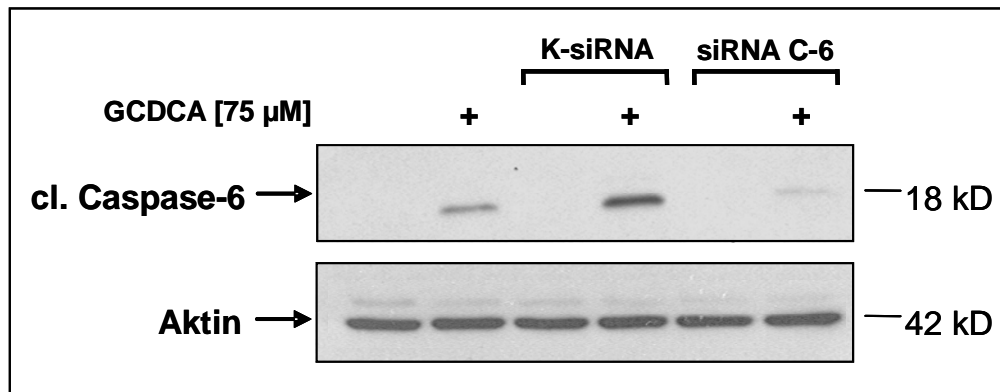


**Abbildung 11. Zeitkinetik einer Transfektion mit (A) 20 nM und (B) 50 nM siRNA gegen Caspase-6.** Zu den angegebenen Zeiten nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Reduktion des endogenen Caspase-6 Gehaltes war bereits 24 h nach Transfektion erkennbar. Splitten der Zellen 24 h nach Transfektion, d. h. Ablösen mittels 1xTrypsin-EDTA und erneutes Aussäen, wirkte sich nicht auf die Gensuppression aus (72 h S). Kontrolle 1 (K1) sind nicht transfizierte Zellen. Kontrolle 2 (K2) sind ohne Zugabe von siRNA transfizierte Zellen. Inkubation des Western-Blots mit Aktin-Antikörper diente als Ladungskontrolle.

## 3.1.3.2 Effekt von GCDCA

24 Stunden nach Transfektion mit siRNA gegen Caspase-6 oder einer Kontroll-siRNA 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-

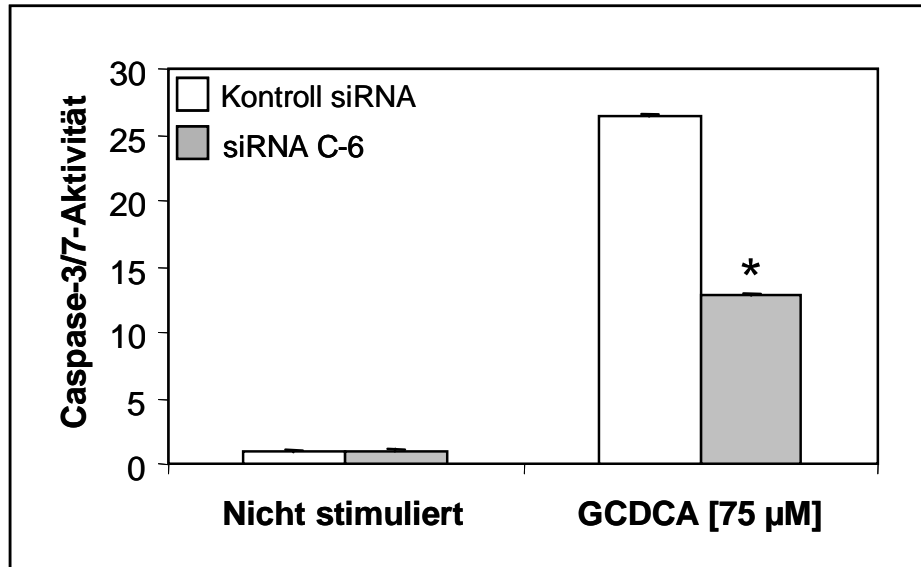
Aktivitätsassay ausgesät. 48 Stunden nach der Transfektion wurden nicht transfizierte, mit Kontroll-siRNA oder mit siRNA gegen Caspase-6 transfizierte Zellen mit 75  $\mu$ M GCDCA oder Trägermedium (Kontrolle) für 2 Stunden inkubiert. Der Western Blot der aktiven Caspase-6 (cleaved Caspase-6) in Abbildung 12 zeigt die eindeutige Reduktion des Proteingehalts durch die siRNA gegen Caspase-6. Die Kontroll-siRNA führte zu einer etwas stärkeren Aktivierung der Caspase-6, da die Transfektion an sich bereits ein leichter apoptotischer Stimulus für Zellen ist. Deshalb müssen die mit siRNA gegen Caspase-6 transfizierten Proben immer mit den Kontroll-transfizierten Proben verglichen werden, um den toxischen Effekt der Transfektion mit einzubeziehen (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12. Transiente Transfektion mit siRNA gegen Caspase-6 reduziert die aktive Caspase-6 (cl. Caspase-6) bei Stimulation mit GCDCA.** HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 50 nM Kontroll-siRNA (K-siRNA), siRNA gegen Caspase-6 oder nicht transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und neu ausgesät. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 2 Stunden mit 75  $\mu$ M GCDCA oder Trägermedium (Kontrolle) inkubiert. Western-Blot mit Gesamtzelllysaten und primären Antikörper gegen aktive Caspase-6 (cl. Caspase-6) zeigt, dass durch die siRNA gegen Caspase-6 die aktive Caspase-6 reduziert wurde. Als Ladungskontrolle diente Aktin.

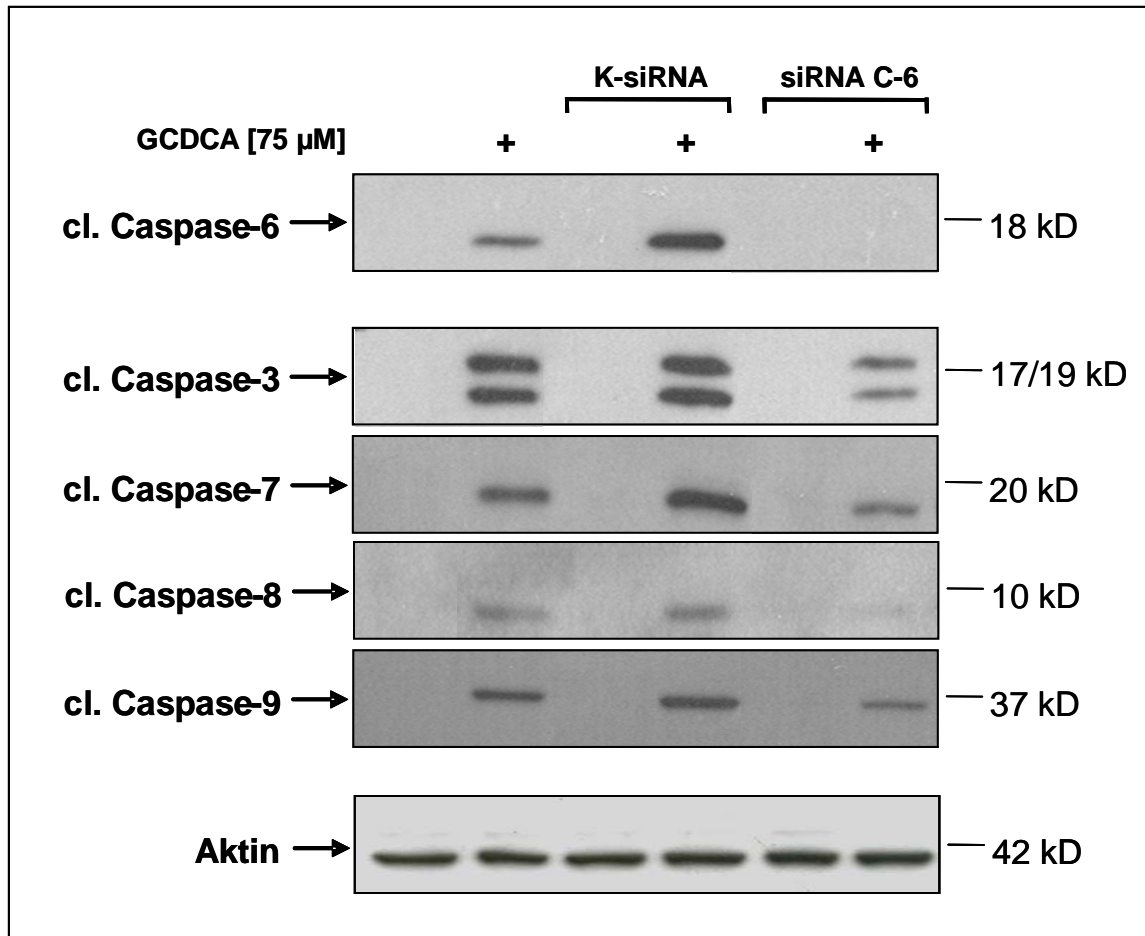
Die Quantifizierung der Apoptoserate 48 Stunden nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA oder siRNA gegen Caspase-6 erfolgte durch einen Caspase-3/7-Aktivitätsassay. Die HepG2-Ntcp Zellen wurden für 2 Stunden mit 75  $\mu$ M GCDCA inkubiert. Dabei war ein signifikanter Rückgang der GCDCA-induzierten Apoptoserate um 52 % nach Reduktion des Caspase-6-Proteingehalts der Zellen zu sehen (s. Abbildung 13).





**Abbildung 13. Caspase-3/7-Aktivität nach Apoptoseinduktion durch GCDCA in Caspase-6 defizienten HepG2-Ntcp Zellen.** 24 h nach Transfektion mit 50 nM Kontroll-siRNA (weiß) und 50 nM siRNA gegen Caspase-6 (grau) wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 2 Stunden mit 75 µM GCDCA inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7 Aktivitätsassay. siRNA gegen Caspase-6 reduzierte die Apoptoserate signifikant. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert. (MW ± SD, n=3, \*p< 0,05, vgl. Kontroll-siRNA)

Die Analyse der Gesamtzelllysate auf Präsenz der anderen aktivierten Caspasen (cleaved Caspasen) durch Western Blot zeigt sehr eindrucksvoll, dass die Caspasen-3,-7,-8 und -9 deutlich in ihrer Aktivität gehemmt waren, wenn der Caspase-6-Proteingehalt der Zellen durch siRNA Transfektion herunter reguliert wurde (s. Abbildung 14).



**Abbildung 14. Knockout der Caspase-6 in HepG2-Ntcp Zellen verringerte die Aktivität der Caspasen-3,-7,-8 und -9.** HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 50 nM Kontroll-siRNA, siRNA gegen Caspase-6 oder nicht transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und neu ausgesät. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 2 Stunden mit 75 µM GCDCA oder Trägermedium inkubiert. Aktivitäten der Caspasen-6,-3,-7,-8 und -9 werden durch Western-Blots aus Gesamtzelllysaten mit den jeweiligen primären Antikörpern gegen die aktiven Caspasen (cl. Caspasen-6,-3,-7,-8 und -9) gezeigt. Aktin diente als Ladungskontrolle.

Aus den letzten drei Abbildungen ist ersichtlich, dass in HepG2 Zellen, die durch siRNA-Transfektion einen stark reduzierten Caspase-6-Proteingehalt aufweisen, nur noch bedingt GCDCA-induzierte Apoptose möglich ist. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Inhibitor Z-VEID-FMK konnten somit durch die Transfektion mit siRNA gegen Caspase-6 bestätigt werden. Da die Aktivität der Caspase-8 durch das Fehlen der Caspase-6 deutlich reduziert war, wird die Annahme unterstützt, dass die Caspase-6 der Caspase-8 vorgeschaltet ist und es somit erst nach der Aktivierung der Caspase-6 über den intrinsischen Weg zu einer Aktivierung der Caspase-8 kommt.

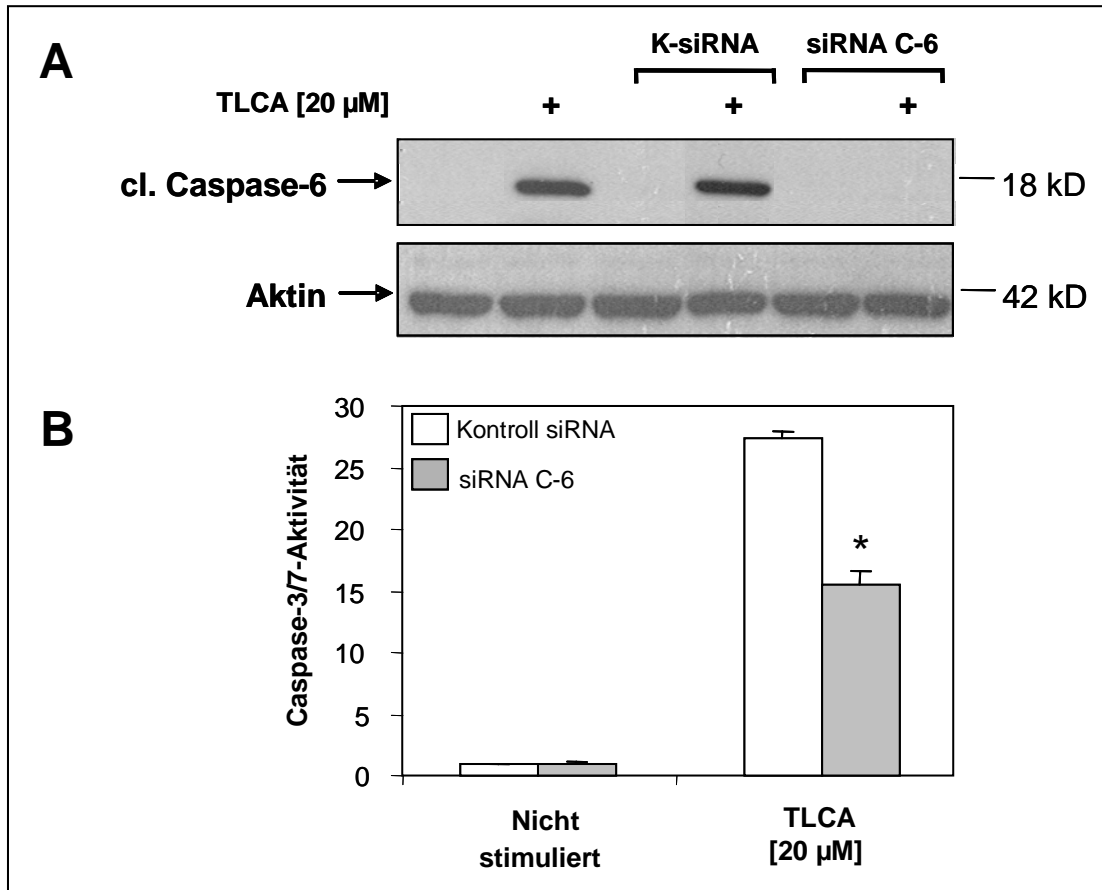
#### 3.1.3.3 *Effekt von TLCA*

Somit stellt sich die Frage, ob Caspase-6 nur für die GCDCA-induzierter Apoptose von Bedeutung ist. Zur Klärung dieser Frage stimulierten wir die mit siRNA gegen Caspase-6 transfizierten HepG2-Ntcp Zellen mit anderen Apoptoseinduktoren.

Als erstes wurde untersucht, wie sich die mit siRNA gegen Caspase-6 transfizierten Zellen bei der Stimulation mit einer anderen toxischen Gallensäure verhalten. Dazu wählten wir die hydrophobe Gallensäure Taurolithocholsäure (TLCA). Da TLCA bei gleicher Konzentration toxischer ist als GCDCA, wählten wir eine niedrigere Konzentration. Die mit Kontroll-siRNA, siRNA gegen Caspase-6 oder nicht transfizierten Zellen wurden für 2 Stunden mit 20  $\mu$ M TLCA inkubiert.

Die Stimulation der HepG2-Ntcp Zellen mit 20  $\mu$ M TLCA hatte einen vergleichbaren Effekt wie die Stimulation mit 75  $\mu$ M GCDCA (vgl. Abbildung 13 und 15). Beide Gallensäuren induzierten in den Kontroll-transfizierten Zellen eine ca. 27-fach höhere Apoptoserate als in den nicht stimulierten Zellen.

Die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen Caspase-6 führte zu einer signifikanten Reduktion der TLCA-induzierten Apoptoserate um 44 % (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15.** Transiente Transfektion mit siRNA gegen Caspase-6 reduziert die aktive Caspase-6 (cl. Caspase-6) und die Caspase-3/7-Aktivität bei Stimulation mit TLCA ähnlich wie bei Stimulation mit GCDCA. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 50 nM Kontroll-siRNA (K-siRNA), mit siRNA gegen Caspase-6 (siRNA C-6) oder nicht transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und neu ausgesät. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 2 Stunden mit 20 µM TLCA oder Trägermedium (Kontrolle) inkubiert. **(A)** Western-Blot mit Gesamtzelllysaten und primären Antikörpern gegen die aktive Caspase-6 (cl. Caspase-6) zeigt, dass die aktive Caspase-6 (cl. Caspase-6) auch bei Stimulation mit TLCA durch die Transfektion mit siRNA gegen Caspase-6 herunter reguliert wurde. **(B)** Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7-Aktivitätsassay. siRNA gegen Caspase-6 reduziert die Apoptoserate bei Stimulation mit TLCA um 44 %. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert (MW ± SD, n=3, p<0,05 vgl. Kontroll siRNA).

Das bedeutet, dass hydrophobe Gallensäuren, wie GCDCA und TLCA, Caspase-6-abhängig Apoptose induzieren und dass die Aktivierung der Caspase-8 und somit der extrinsische Signalweg abhängig von der Aktivierung der Caspase-6 ist.

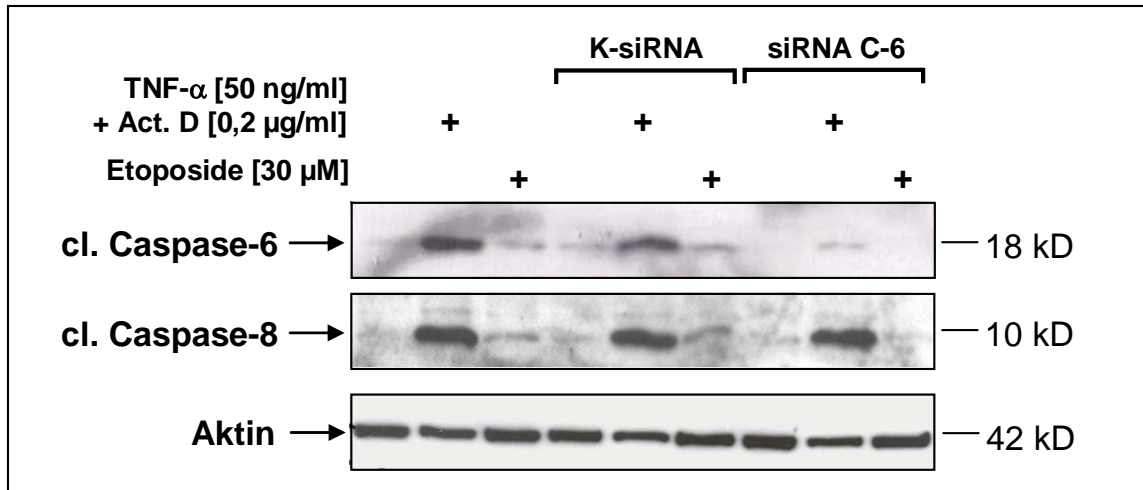
Um zu klären, ob es sich dabei um einen Gallensäuren-spezifischen Effekt handelt, testeten wir einige andere Apoptoseinduktoren.

#### 3.1.3.4 Effekt von Etoposid bzw. TNF- $\alpha$ und Actinomycin D

Etoposid induziert Apoptose todesrezeptorunabhängig über den mitochondrialen Weg. Etoposid induziert die Phosphorylierung von Bax durch die JNK und die p38 Kinase. Bax transloziert in die Mitochondrienmembran und aktiviert damit die Apoptose über die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit verbundener Freisetzung zahlreicher proapoptotischer Substanzen.<sup>135</sup>

TNF- $\alpha$  induziert im Gegensatz zu Gallensäuren und Etoposid die Apoptose über den extrinsischen, Todesrezeptor vermittelten Weg. TNF- $\alpha$  bindet an den Todesrezeptor TNF- $\alpha$  R1 und löst ausschließlich über diesen Apoptose aus. In Typ-II-Zellen, wie den Hepatozyten, wird das apoptotische Signal zusätzlich über die Mitochondrien verstärkt. TNF- $\alpha$  aktiviert gleichzeitig auch Überlebenssignale. Deshalb wurde bei TNF- $\alpha$ -Stimulation Actinomycin D hinzugegeben, das die Überlebenssignale blockiert.

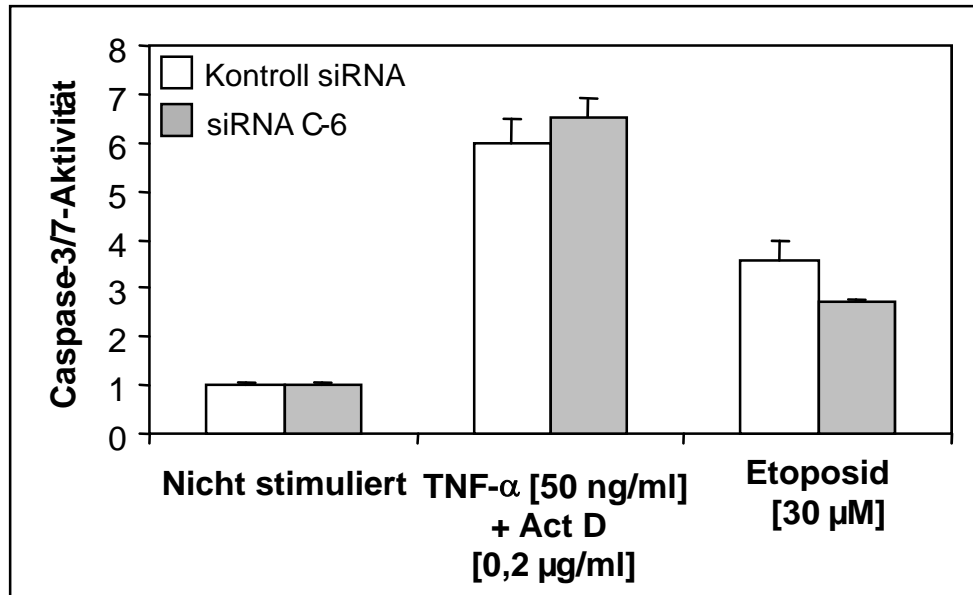
48 Stunden nach Transfektion wurden nicht transfizierte, mit Kontroll-siRNA oder mit siRNA gegen Caspase-6 transfizierte Zellen mit TNF- $\alpha$  [50 ng/ml] und Actinomycin D [0,2  $\mu$ g/ml] bzw. 30  $\mu$ M Etoposid oder Trägermedium (Kontrolle) für 24 Stunden inkubiert. Der Caspase-6-Western Blot in Abbildung 16 zeigt die eindeutige Reduktion der aktiven Caspase-6 (cl. Caspase-6) durch siRNA gegen Caspase-6. Das Ausschalten der Caspase-6 durch siRNA hemmte bei Stimulation mit Etoposid die Aktivierung der Caspase-8. Bei Stimulierung mit TNF- $\alpha$  und Actinomycin D wurde die Aktivität der Caspase-8 durch den reduzierten Proteingehalt an Caspase-6 kaum beeinflusst (s. Abbildung 16).



**Abbildung 16. Stimulation Caspase-6-defizienter Zellen mit TNF- $\alpha$  und Actinomycin D bzw. Etoposid.** HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 50 nM Kontroll-siRNA (K-siRNA) und siRNA gegen Caspase-6 (siRNA C-6) oder nicht transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst und neu ausgesät. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  + 0,2 µg/ml Actinomycin D oder 30 µM Etoposid inkubiert oder nicht stimuliert. Western-Blot mit Gesamtzelllysaten und primärem Antikörper gegen die aktive Caspase-6 (cl. Caspase-6) zeigt die Reduktion der Caspase-6 Aktivität durch die siRNA gegen Caspase-6. Die Aktivität der Caspase-8 (cl. Caspase-8) war bei blockierter Caspase-6 und Stimulation mit Etoposid reduziert, bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Actinomycin D (Act D) hingegen unverändert. Als Ladungskontrolle diente Aktin.

Die Quantifizierung der Apoptoserate erfolgte durch den Caspase-3/7-Aktivitätsassay. 48 Stunden nach Transfektion wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 24 Stunden mit TNF- $\alpha$  [50 ng/ml] und Actinomycin D [0,2 µg/ml] bzw. 30 µM Etoposid oder Trägermedium (Kontrolle) inkubiert (s. Abbildung 17).

Die Etoposid-induzierte Caspase-3/7-Aktivität wurde durch Transfektion der Zellen mit siRNA gegen Caspase-6 um 25 % nicht signifikant reduziert. Die durch TNF- $\alpha$  und Actinomycin D-induzierte Apoptoserate nahm in Caspase-6 defizienten Zellen sogar tendenziell etwas zu (s. Abbildung 17).



**Abbildung 17. Caspase-3/7-Aktivität nach Apoptoseinduktion durch TNF- $\alpha$  und Actinomycin D bzw. Etoposid in Caspase-6 defizienten HepG2-Ntcp Zellen.** 24 Stunden nach Transfektion mit 50 nM Kontroll-siRNA (weiß) und siRNA gegen Caspase-6 (grau) wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  + 0,2  $\mu$ g/ml Actinomycin D oder 30  $\mu$ M Etoposid inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7-Aktivitätsassay. siRNA gegen Caspase-6 reduzierte die Apoptoserate nach Stimulation mit Etoposid, allerdings nicht die nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Actinomycin D. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert (MW  $\pm$  SD, n=3).

Das Ausschalten der Caspase-6 hemmte die Etoposid-induzierte Aktivierung der anderen Caspasen nur sehr schwach und nicht signifikant.

Bei TNF- $\alpha$  und Actinomycin D-Stimulation wird der Zelltod über die Aktivierung von Todesrezeptoren eingeleitet. Bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Actinomycin D wurde durch Blockierung der Caspase-6 die Aktivität der anderen Caspasen nicht reduziert.

Caspase-6 scheint somit für die Gallensäuren-induzierte Apoptose, nicht aber für die TNF- $\alpha$ - und Etoposid-induzierte Apoptose von essentieller Bedeutung zu sein (s. Abbildung 17).

### 3.1.4 Blockierung der Caspase-9 mit dem spezifischen Inhibitor Z-LEHD-FMK

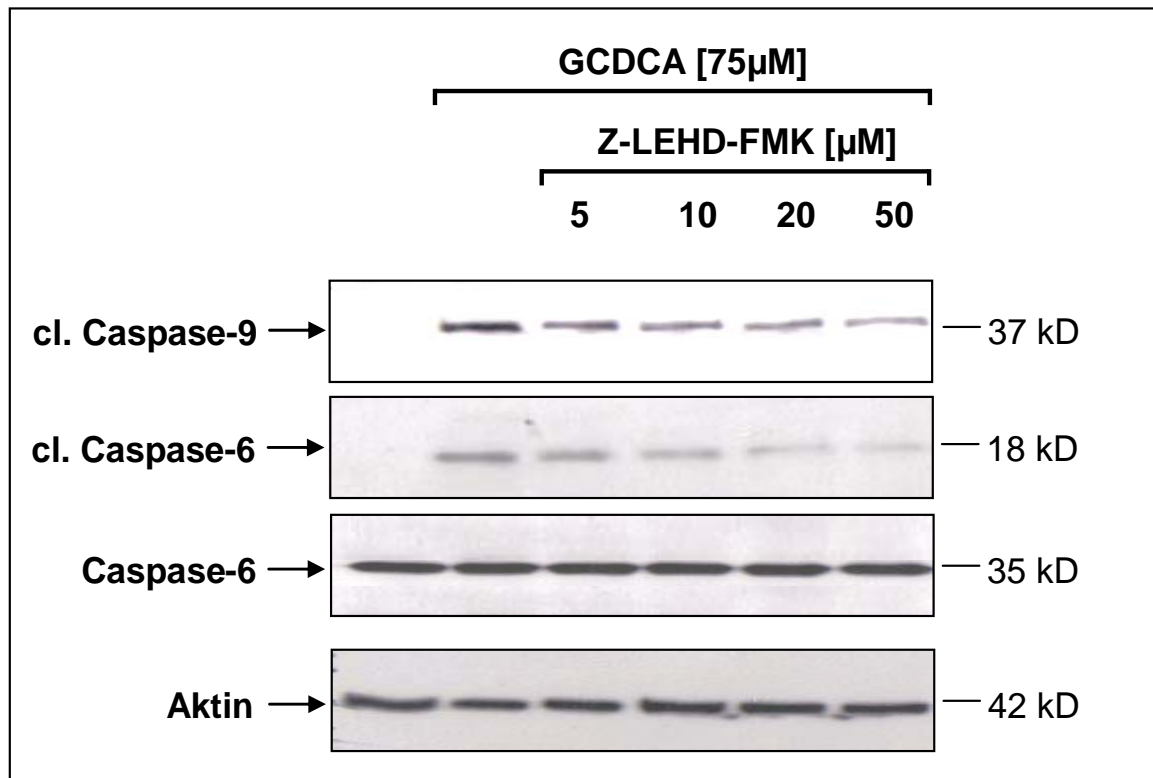
Die Inhibitor- und siRNA-Versuche gegen Caspase-6 haben gezeigt, dass die Blockierung der Caspase-6 auch zu einer Reduktion der Caspase-8-Aktivität führt. Dadurch wird

deutlich, dass die Caspase-6 der Caspase-8 im intrinsischen Reaktionsweg vorgeschaltet ist. Nachfolgend wurde untersucht, ob die Caspase-6 der Caspase-9 nachgeschaltet ist, um die Position der Caspase-6 in der Caspasen-Kaskade eindeutig zu klären.

Zunächst setzten wir wieder einen spezifischen Inhibitor ein, diesmal gegen Caspase-9. Der Inhibitor Z-LEHD-FMK besitzt die Eigenschaft, über die Aminosäuren Leucin (L), Glutaminsäure (E), Histidin (H) und Asparaginsäure (D) direkt im katalytischen Zentrum der Caspase-9 zu binden.

Die Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit 75  $\mu\text{M}$  GCDCA zeigte eine deutliche Aktivierung der Caspasen-6 und -9. Gleichzeitige Zugabe des Caspase-9 spezifischen Inhibitors Z-LEHD-FMK in Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  – 50  $\mu\text{M}$  resultierte in einer deutlichen Inhibierung der aktiven Caspase-9 (cl. Caspase-9) und einer vergleichbaren Inhibierung der Caspase-6 (cl. Caspase-6) (s. Abbildung 18).





**Abbildung 18. Z-LEHD-FMK (5 – 50  $\mu\text{M}$ ) inhibiert Caspase-9.** Hep-G2-Ntcp Zellen wurden 2h mit Trägermedium (Kontrolle), mit GCDCA (75  $\mu\text{M}$ ) allein oder zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen Z-LEHD-FMK (5  $\mu\text{M}$  -50  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen aktivierte (cleaved) Caspase-9 (cl. Caspase-9) und -6 (cl. Caspase-6) zeigen die Aktivierung der jeweiligen Caspase. Western Blots mit Antikörpern gegen unprozessierte Caspase-6 zeigen, dass nur die aktive Form der Caspase-6 durch die Blockierung der Caspase-9 reduziert wurde. Aktin diente als Ladungskontrolle.

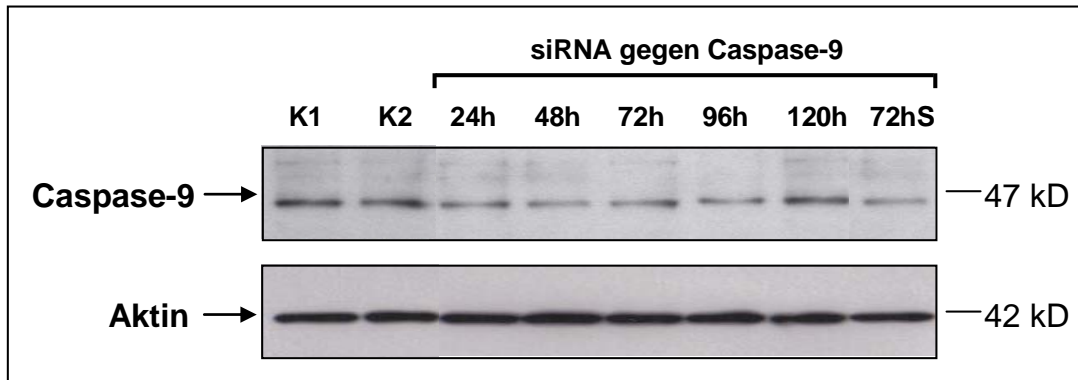
Die Abbildung 18 zeigt, dass die Aktivierung der Caspase-6 abhängig von Caspase-9 ist. Die Caspase-9 scheint somit der Caspase-6 vorgeschaltet zu sein und die Prozessierung der inaktiven Caspase-6 zu induzieren.

### 3.1.5 Inhibierung der Caspase-9-Expression durch siRNA-Transfektion

#### 3.1.5.1 Zeitkinetik

Um die durch den Inhibitor Z-LEHD-FMK gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, und einen unspezifischen Effekt des Inhibitors auszuschließen, verwendeten wir zur

Ausschaltung der Caspase-9 zusätzlich die Methode der siRNA-Transfektion. Die Transfektion mit siRNA gegen Caspase-9 (50 nM) reduzierte den Caspase-9-Proteingehalt bereits am 2. Tag nach Transfektion deutlich (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19. Zeitkinetik einer Transfektion mit 50 nM siRNA gegen Caspase-9.** Hep-G2-Ntcp Zellen wurden mit 50 nM siRNA gegen Caspase-9 transfiziert. Zu den angegebenen Zeiten nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Reduktion des endogenen Caspase-9-Gehalts ist 48 Stunden nach Transfektion erkennbar. Splitten der Zellen 24 Stunden nach Transfektion, d. h. Ablösen mittels 1xTrypsin-EDTA und erneutes Aussäen, wirkte sich nicht auf die Gensuppression aus (72h S). Kontrolle 1 sind nicht transfizierte Zellen, Kontrolle 2 sind mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Aktin diente als Ladungskontrolle.

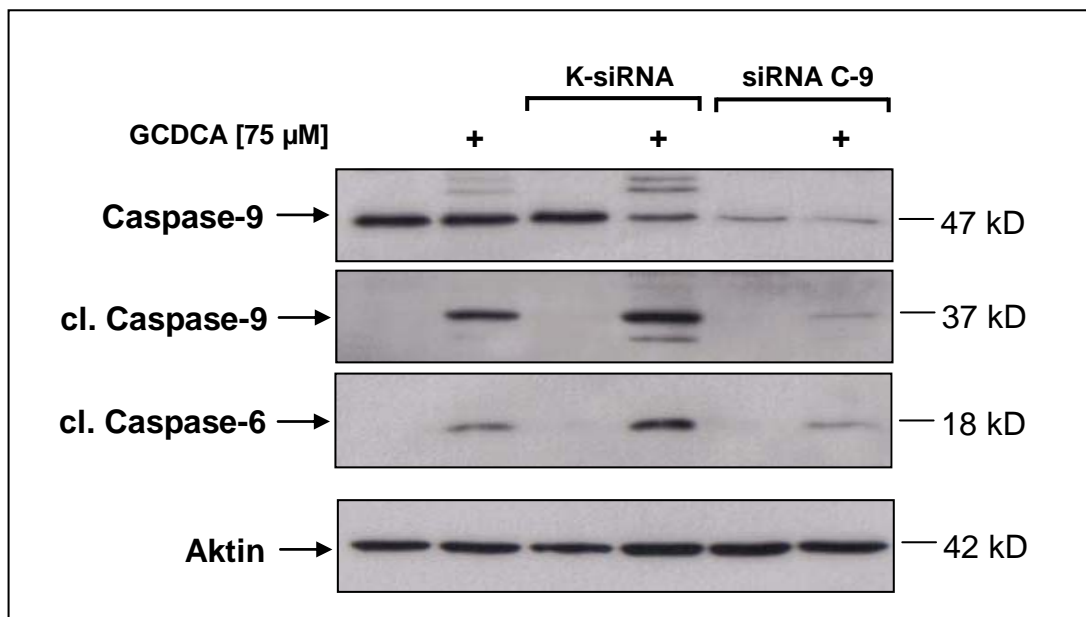
#### 3.1.5.2 Effekt von GCDCA

In den Versuchen mit dem spezifischen Inhibitor Z-LEHD-FMK haben wir gesehen, dass aktive Caspase-9 vorhanden sein muss, damit die Caspase-6 aktiviert wird. Ein analoges Ergebnis erhielten wir durch die Reduktion des Proteingehalts an Caspase-9 durch die Transfektion mit der entsprechenden siRNA.

24 Stunden nach Transfektion der Hep-G2-Ntcp-Zellen mit siRNA gegen Caspase-9 oder Kontroll-siRNA, wurden die Zellen vereinigt und für den Western Blot ausgesät (s. Abbildung 20). 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 75  $\mu$ M GCDCA oder Trägermedium (Kontrolle) für 4 Stunden stimuliert. Der Caspase-9-Western Blot in Abbildung 20 zeigt die eindeutige Reduktion des Proteingehalts der Caspase-9 durch die Transfektion mit siRNA gegen Caspase-9. Bei Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA und gleichzeitiger Stimulation mit 75  $\mu$ M GCDCA ist der Proteingehalt der unprozessierten Caspase-9 etwas reduziert, da hierbei die volle Länge der Caspase-9 zur

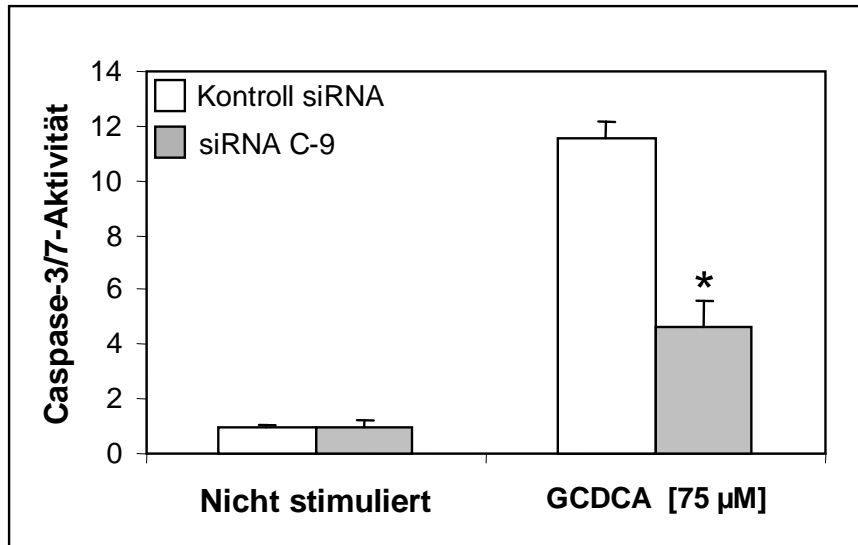
aktiven, kürzeren Form der Caspase-9 (cleaved Caspase-9) prozessiert wird. Deshalb ist die Reduktion des Proteingehaltes der Caspase-9 am deutlichsten an den nicht stimulierten Banden zu sehen.

Die Analyse der Gesamtzelllysate auf Präsenz der aktivierten (cleaved) Caspase-6 und -9 durch Western-Blot zeigt sehr eindrucksvoll, dass nur die mit GCDCA stimulierten Proben aktive Caspasen aufweisen. Reduktion der Caspase-9 durch siRNA hemmt nach GCDCA-Stimulation die Aktivierung der Caspase-6 (s. Abbildung 20).



**Abbildung 20. Knockout der Caspase-9 in HepG2-Ntcp Zellen verhindert die GCDCA-induzierte Aktivierung der Caspase-6.** HepG2-Ntcp Zellen wurden mit 50 nM siRNA gegen Caspase-6 (siRNA C-6) und Kontroll-siRNA (K-siRNA) oder nicht transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst und neu ausgesät. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen 2 Stunden mit 75 µM GCDCA oder Trägermedium (Kontrolle) inkubiert. Western Blot mit Gesamtzelllysaten und primärem Antikörpern gegen Caspase-9 zeigt die Reduktion des Caspase-9-Proteingehalts durch siRNA gegen Caspase-9. Auch das Signal der aktiven Caspase-9 (cleaved Caspase-9) ist durch die Transfektion mit siRNA gegen Caspase-9 deutlich geschwächt. Aktive Caspase-6 (cleaved Caspase-6) ist in den Caspase-9 defizienten Zellen deutlich reduziert. Als Ladungskontrolle diente Aktin.

Die Quantifizierung der Apoptoserate erfolgte durch den Caspase-3/7-Aktivitätsassay. Die HepG2-Ntcp Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion für 2 Stunden mit GCDCA 75 µM stimuliert. In den mit Caspase-9 siRNA-transfizierten Zellen war die GCDCA-induzierte Apoptose signifikant um 60 % niedriger als in den kontrolltransfizierten Zellen (s. Abbildung 21).

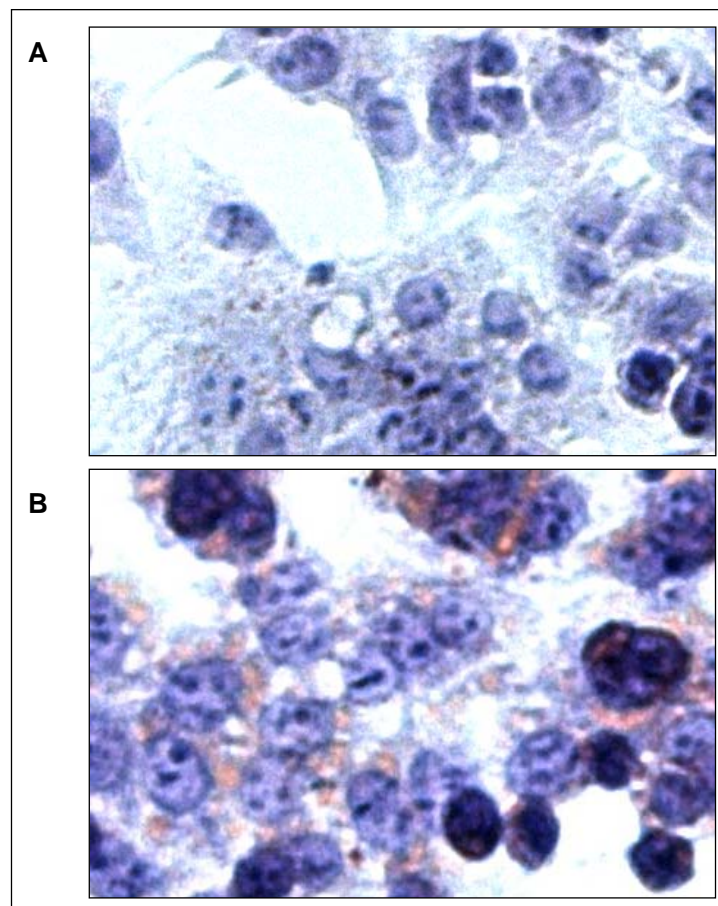


**Abbildung 21. Caspase-3/7-Aktivität nach Apoptoseinduktion in Caspase-9 defizienten HepG2-Ntcp Zellen.** 48 Stunden nach Transfektion mit 50 nM Kontroll-siRNA (weiß) und siRNA gegen Caspase-9 (grau) wurden HepG2-Ntcp Zellen für 2 Stunden mit 75 µM GCDCA inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7-Aktivitätsassay. siRNA gegen Caspase-9 reduzierte signifikant die Apoptoseinduktion durch GCDCA. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert (MW ± SD, n=3, \*p<0,05 vgl. Kontroll siRNA).

## 3.2 Untersuchung der Gallensäuren-induzierten Apoptose bei Steatose in einem Zellkulturmodell

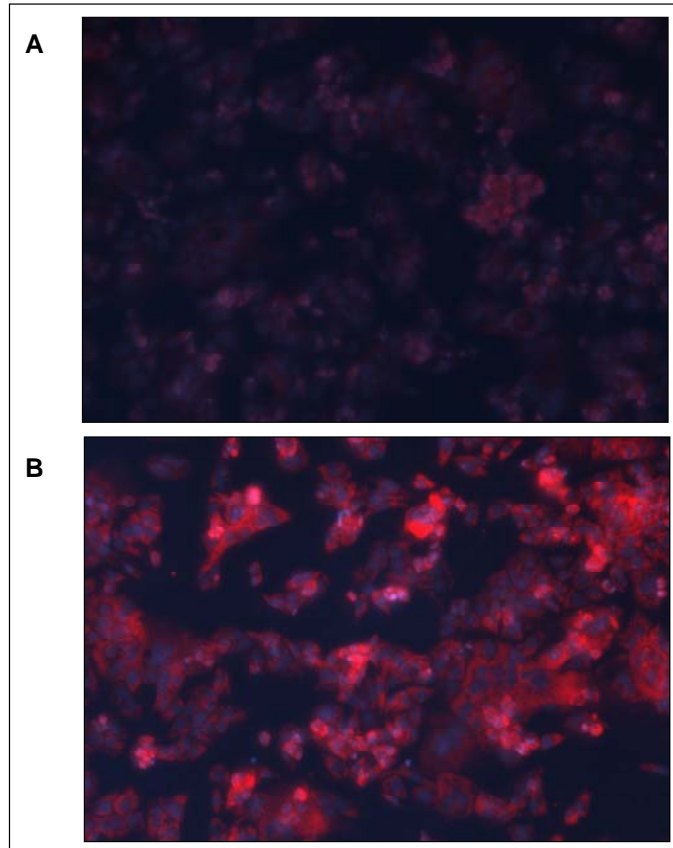
### 3.2.1 Zelluläre Steatose durch Inkubation mit langkettigen Fettsäuren

HepG2-Ntcp Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,5 mM Ölsäure und 1 % Rinderserumalbumin im Medium inkubiert. Dabei entwickelten sie eine signifikante Anreicherung von Lipidvakuolen im Zytosol. Die intrazellulären Lipidvakuolen wurden mit Sudanrot angefärbt. In Abbildung 22 (A) sieht man die mit Hämatoxylin blauviolett angefärbten Zellkerne und das hellbaue Zytosol. In der Abbildung 23 (B) sieht man zusätzlich die hellrot gefärbten Lipidvakuolen im Zytosol der Zellen.



**Abbildung 22. Sudanfärbung.** HepG2-Ntcp Zellen wurden auf einem Deckgläschen ausgesät. 48 Stunden danach wurden sie mit Formalin fixiert und mit Hämatoxylin und Sudanrot angefärbt. **(A)** Unverfettete HepG2-Ntcp Zellen; **(B)** HepG2-Ntcp Zellen wurden vor der Färbung für 24 Stunden mit 0,5 mM Ölsäure inkubiert.

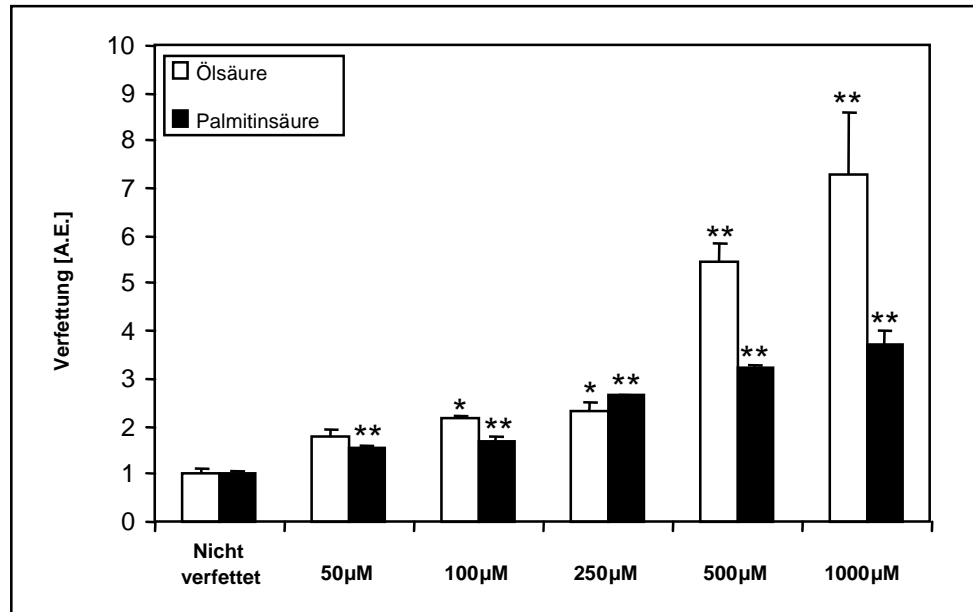
Als zweite Darstellungsmethode der verfetteten Zellen verwendeten wir die Nilrot-Färbung, die mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht wurde. In Abbildung 23 (A) sieht man blaugefärbte Kerne der nichtverfetteten Zellen. In Abbildung 23 (B) sieht man zusätzlich das rotfluoreszierende Fett in den Zellen.



**Abbildung 23. Nilrot-Fluoreszenzmikroskopie.** HepG2-Ntcp Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Kernfarbstoff Höchst (blau) und Nilrot (rot) angefärbt. **(A)** Unversehrte HepG2-Ntcp Zellen; **(B)** HepG2-Ntcp Zellen wurden vor der Färbung für 24 Stunden mit 0,5 mM Ölsäure inkubiert. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen.

Zusätzlich wurde die Verfettung der Zellen über die fluorometrische Messung der Nilrot-Fluoreszenz quantifiziert (Fläche der Verfettung/Gesamtfläche x 100) (s. Abbildung 24). Sowohl bei der Ölsäure als auch bei der Palmitinsäure nahm mit steigender Fettsäurekonzentration auch die Verfettung der Zellen zu.

In niedrigen Konzentrationen war die Steatose der Zellen durch Palmitinsäure oder Ölsäure ähnlich stark ausgeprägt. In höheren Konzentrationen wirkte die Palmitinsäure toxisch auf die Zellen. Die Zellzahl nahm bei steigendem Verfettungsgrad ab.



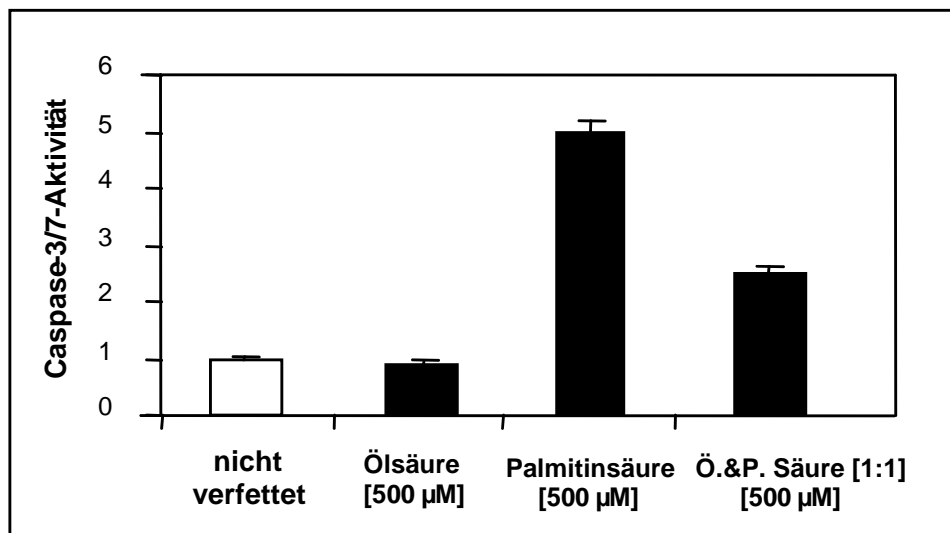
**Abbildung 24. Quantifizierung der Verfettung der Zellen über Nilrot: mit Steigerung der Fettsäurekonzentration nimmt der Verfettungsgrad der Zellen zu.** HepG2-Ntcp Zellen wurden im 96er-Wellformat ausgesät und einen Tag später für 24 Stunden mit Ölsäure bzw. Palmitinsäure (50 µM – 1000 µM) verfettet oder nicht verfettet. Anschließend wurde das Fett mit Nilrot angefärbt. Das Nilrot-Fluoreszenzsignal konnte mittels Fluorometrie gemessen werden. Die nicht verfetteten Zellen wurden auf 1 normiert (MW ± SD, n=3, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vgl. nicht verfettet).

#### 3.2.2 Unterschiedliche apoptotische Wirkung langkettiger Fettsäuren

Palmitinsäure (C16:0) und Ölsäure (C18:1) sind die am häufigsten vorkommenden freien Fettsäuren (free fatty acids, FFAs) in Lebertriglyceriden, sowohl bei gesunden Menschen als auch bei Patienten mit einer NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease).<sup>136</sup>

Deshalb wurden die HepG2-Ntcp Zellen mit gesättigter (Palmitinsäure) und/oder ungesättigter (Ölsäure) Fettsäure inkubiert. Es zeigt sich, dass bei Verfettung der Zellen mit Ölsäure (Oleic Acid) (0,5 mM) die Apoptoserate unbeeinflusst blieb. Dahingegen wurde die Apoptoserate durch die Verfettung der Zellen mit Palmitinsäure (Palmitic Acid) (0,5 mM) um das 5-fache gesteigert.

Wurden die Zellen mit einer Kombination beider Fettsäuren (Oleic & Palmitic Acid, 1:1) (0,5 mM) behandelt, zeigte sich eine ca. 50 %-ige Reduktion der Apoptoserate gegenüber der Verfettung mit Palmitinsäure (0,5 mM). Erklären läßt sich dies dadurch, dass bei der 1:1-Kombination die Palmitinsäure nur in halber Konzentration enthalten war und somit auch nur die Hälfte der proapoptotischen Wirkung hatte. Dies deutet darauf hin, dass die Ölsäure auch in Kombination mit Palmitinsäure keinerlei apoptotische Effekt auf die Zellen hatte (s. Abbildung 25).



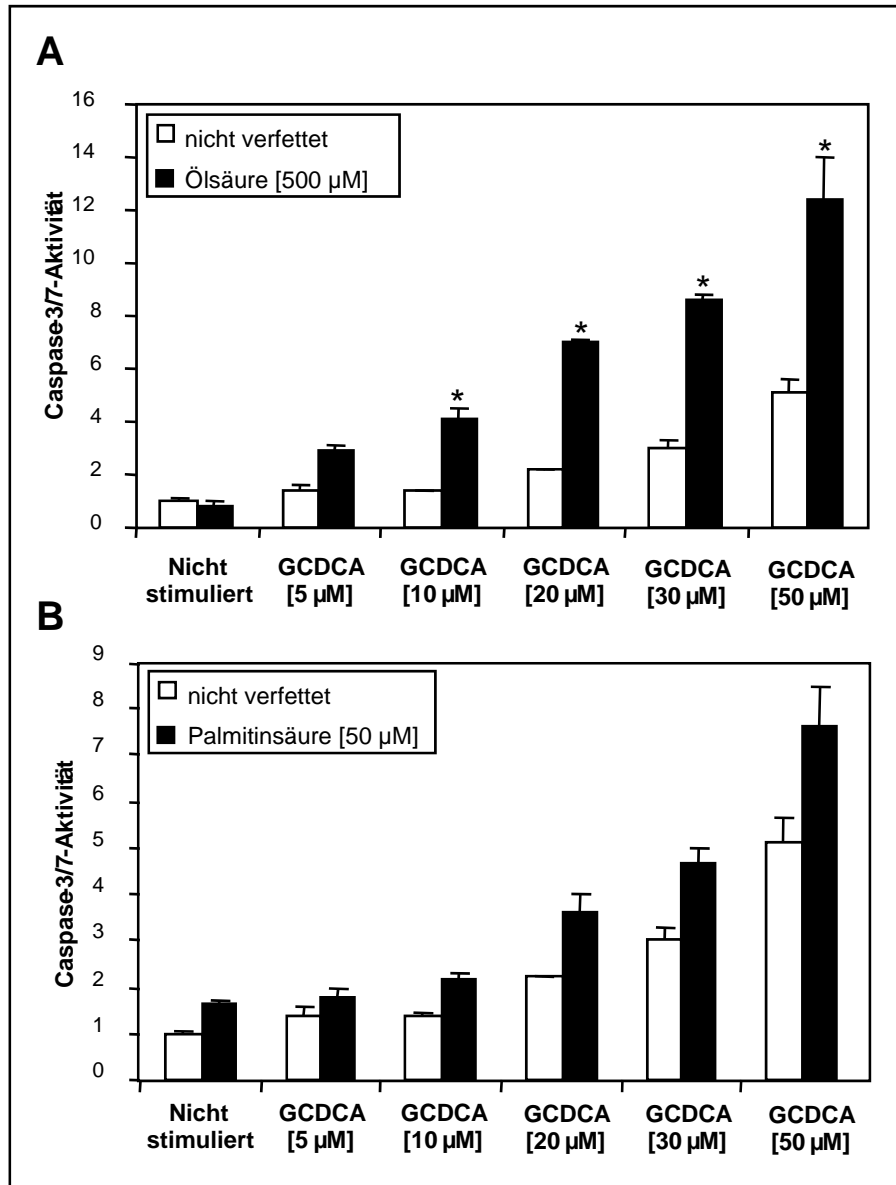
**Abbildung 25. Beeinflussung der Caspase-3/7-Aktivität durch Verfettung der Zellen.** HepG2-Ntcp Zellen wurden für 24 Stunden mit Oleic Acid [500 µM], Palmitic Acid [500 µM] oder einer Kombination von beiden [500 µM] inkubiert. Die Verfettung der Zellen mit Palmitinsäure induzierte eine Steigerung der Apoptoserate um das 5-fache, hingegen die Verfettung mit Ölsäure in gleicher Konzentration keinerlei proapoptotische Wirkung hatte. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht verfetteten Zellen wurde auf 1 normiert (MW ± SD, n=3).

### 3.2.3 Effekt von GCDCA in steatotischen Hepatozyten

HepG2-Ntcp Zellen wurden für 24 Stunden mit 500 µM Ölsäure (Oleic Acid) oder mit 50 µM Palmitinsäure (Palmitic Acid) inkubiert. Die Konzentration der Palmitinsäure wählten wir bewusst niedriger als die der Ölsäure, da, wie in Abbildung 23 gezeigt, die Toxizität der Palmitinsäure weitaus höher ist, als die der Ölsäure bei gleicher Konzentration. Danach wurden sie für 4 Stunden mit der hydrophoben Gallensäure GCDCA [5 µM - 50 µM] stimuliert.



Aus Abbildung 26 wird ersichtlich, dass mit Steigerung der GCDCA-Konzentration die Apoptoserate der nichtverfetteten, als auch der verfetteten Zellen dosisabhängig zunahm. In den nicht verfetteten Zellen führte die Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  GCDCA zu einer Steigerung der Apoptoserate um das 1,4-fache und mit 50  $\mu\text{M}$  um das 5,2-fache verglichen mit den unstimulierten Zellen. Die Verfettung der Zellen mit Ölsäure führte durchweg zu einer signifikanten Steigerung der GCDCA-induzierten Caspase-3/7-Aktivität bei gleichen experimentellen Bedingungen. 10  $\mu\text{M}$  GCDCA führte zu einer Zunahme der Apoptoserate um das 4-fache und 50  $\mu\text{M}$  um das 12,4-fache verglichen mit den unstimulierten Zellen (s. Abbildung 26).

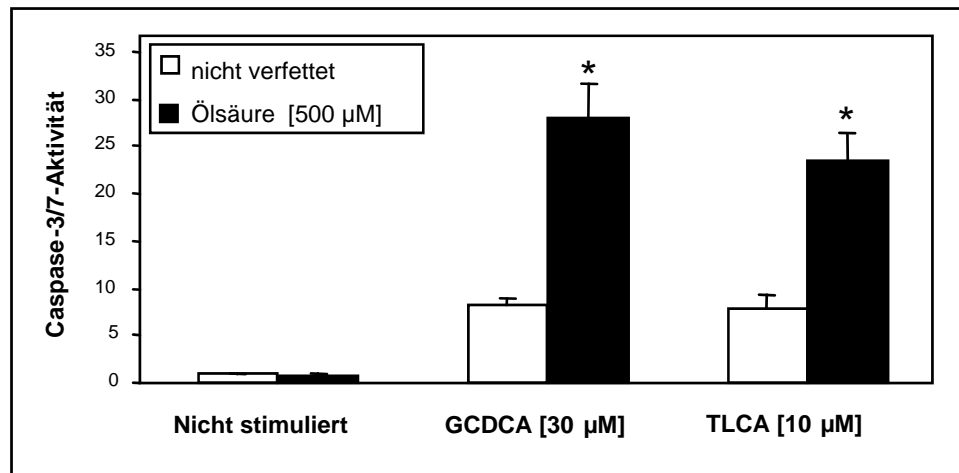


**Abbildung 26. Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität durch Verfettung der Zellen bei Stimulation mit GCDCA.** 24 Stunden nach Verfettung mit (A) Ölsäure [500 µM] oder (B) Palmitinsäure [50 µM] wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 4 Stunden mit 30 µM GCDCA inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7-Aktivitätsassay. Die Steatosis macht die HepG2-Ntcp Zellen sensitiver für die durch GCDCA induzierte Apoptose. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht verfetteten und nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert (MW ± SD, n=3, \*p<0,05 vgl. nicht verfettet).

### 3.2.4 Effekt von TLCA in steatotischen Hepatozyten

Einen ähnlichen Effekt konnten wir auch bei der Stimulation der verfetteten Zellen mit einer anderen hydrophoben Gallensäure verzeichnen. Die Stimulation nicht verfetteter

HepG2-Ntcp Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  TLCA führte zu einer deutlichen Caspase-3 und -7-Aktivierung. Die zusätzliche Verfettung der Zellen mit 500  $\mu\text{M}$  Ölsäure erhöht die Apoptoserate um mehr als das Doppelte verglichen mit nicht verfetteten Zellen. Der Effekt ist mit dem der hydrophoben Gallensäure GCDCA vergleichbar (s. Abbildung 27).



**Abbildung 27. Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität durch Verfettung der Zellen bei Stimulation mit GCDCA und TLCA.** 24 Stunden nach Verfettung der Zellen mit 500  $\mu\text{M}$  Ölsäure (Oleic Acid) wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 4 Stunden mit 30  $\mu\text{M}$  GCDCA oder 10  $\mu\text{M}$  TLCA inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7-Aktivitätsassay. Die Steatose macht die HepG2-Ntcp Zellen sensitiver für die durch GCDCA bzw. TLCA induzierte Apoptose. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht verfetteten und nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert (MW  $\pm$  SD, n=3, \*p<0,05 vgl. nicht verfettet).

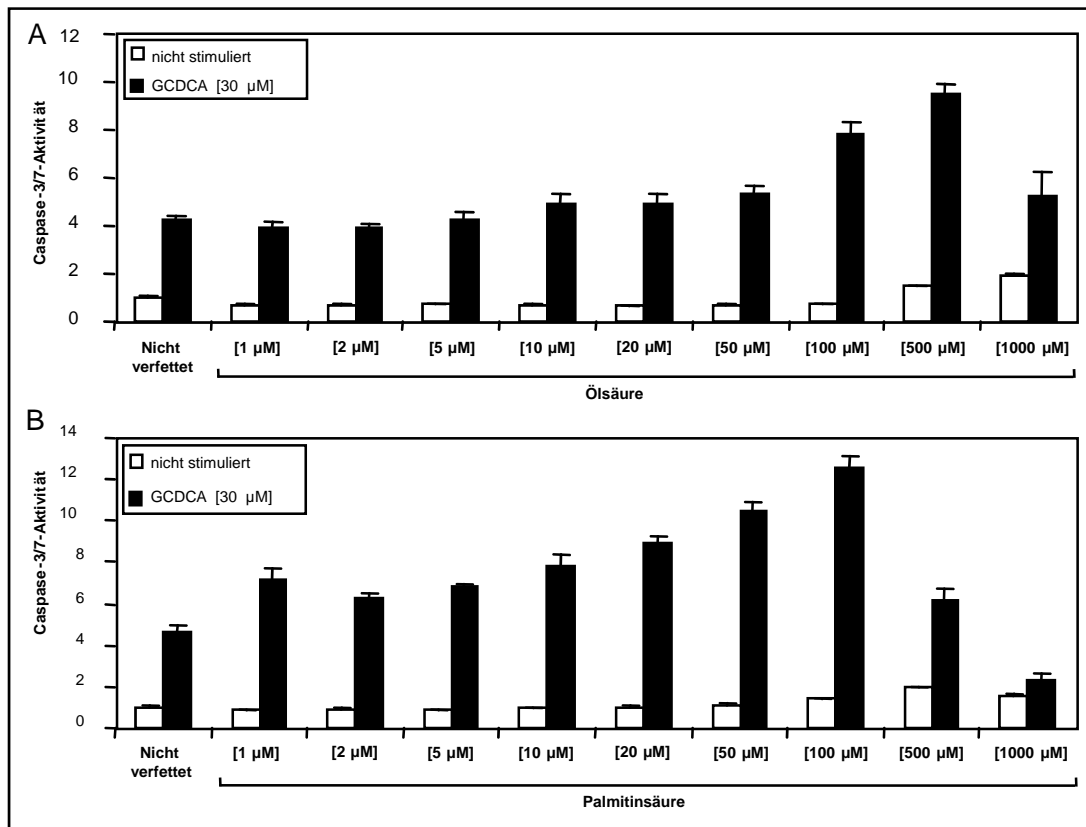
#### 3.2.5 Abhängigkeit der Apoptoserate vom Grad der Steatose

In einer Konzentrationsreihe der Verfettung mit Ölsäure (1  $\mu\text{M}$  - 500  $\mu\text{M}$ ) oder Palmitinsäure (1  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$ ) wird ersichtlich, dass mit zunehmender Verfettung der HepG2-Ntcp Zellen die GCDCA-induzierte Apoptoserate zunahm.

Die Palmitinsäure (bis 50  $\mu\text{M}$ ) und die Ölsäure (bis 100  $\mu\text{M}$ ) alleine, d. h. ohne GCDCA-Stimulation hatten in niedrigen Konzentrationen keinerlei apoptotische Wirkung auf die Zellen. Die GCDCA (30  $\mu\text{M}$ )-induzierte Apoptoserate wurde allerdings durch die Verfettung der Zellen deutlich gesteigert.

Bei Verfettung der mit 30  $\mu\text{M}$  GCDCA stimulierten Zellen mit nur 1  $\mu\text{M}$  Palmitinsäure wurde die Apoptoserate verglichen mit nichtverfetteten Zellen um ca. 40 % gesteigert. Ölsäure verstärkte in der gleichen Konzentration den apoptotischen Effekt von GCDCA nicht. In einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  führten beide Fettsäuren zu einer deutlichen Steigerung der durch GCDCA induzierten Apoptoserate, die Ölsäure um das fast 2-fache, die Palmitinsäure sogar um mehr als das 2,5-fache. 500  $\mu\text{M}$  der Ölsäure führten zu einer weiteren Steigerung der GCDCA-induzierten Apoptoserate auf mehr als das 2-fache. Die Palmitinsäure hatte bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  bereits einen toxischen Effekt auf die Zellen. Hohe Fettsäurekonzentrationen führten nicht mehr zu einer weiteren Steigerung der GCDCA-induzierten Caspase-3/7-Aktivität. Bei der Palmitinsäure (500  $\mu\text{M}$ ) war dies bereits früher der Fall als bei der Ölsäure (1000  $\mu\text{M}$ ). Mitverantwortlich hierfür könnte sein, dass die Palmitinsäure bei gleicher Konzentration wesentlich toxischer für die Zellen ist als die Ölsäure (s. Abbildung 28).

### 3 ERGEBNISSE



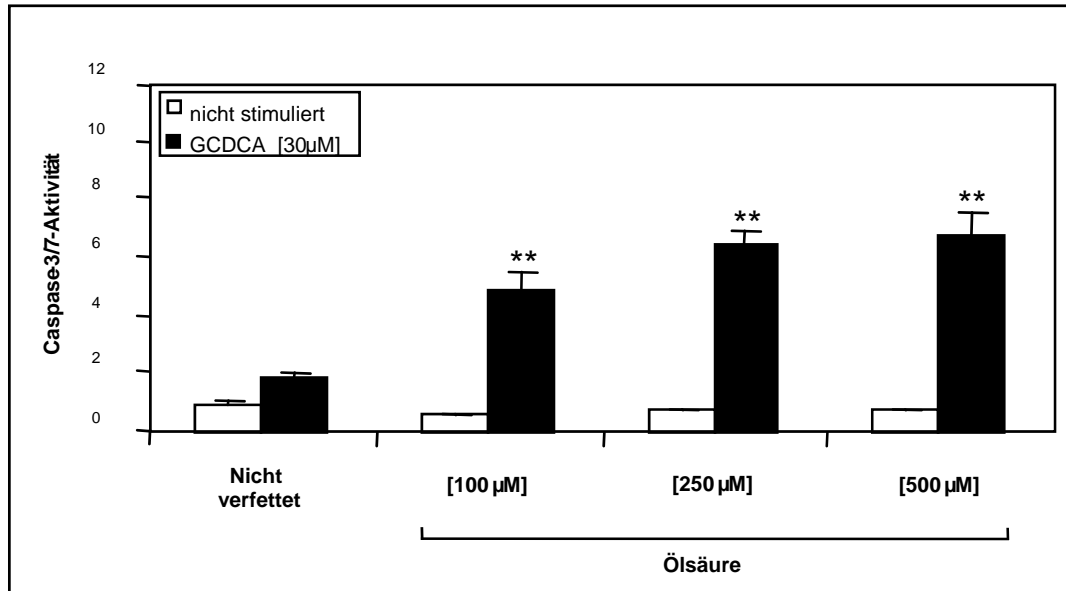
**Abbildung 28. Konzentrationssteigerung von Ölsäure oder Palmitinsäure führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität nach Apoptoseinduktion.** 24 Stunden nach Verfettung der Zellen mit 1 µM – 1000 µM Ölsäure (Oleic Acid) oder Palmitinsäure (Palmitic Acid) wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 4 Stunden mit 30 µM GCDCA inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7-Aktivitätsassay. Mit der Zunahme der Verfettung war auch eine Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität bei Stimulation mit GCDCA zu sehen. Im höheren Konzentrationsbereich fiel die Apoptoserate wieder ab. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht verfetteten und nicht stimulierten Zellen wurde auf

Die steigende Sensitivität der Zellen für Gallensäuren-induzierte Apoptose durch die Verfettung konnten wir auch in primären Rattenhepatozyten nachweisen. Da man primäre Rattenhepatozyten nach Gewinnung nur zeitlich begrenzt kultivieren kann, reduzierten wir die Inkubationszeit mit der Ölsäure auf 12 Stunden. Danach wurden die primären Rattenhepatozyten wie die HepG2-Ntcp Zellen für 4 Stunden mit GCDCA stimuliert.

Die Stimulation mit GCDCA in niedriger Konzentration (30 µM) induzierte in nicht verfetteten primären Hepatozyten keine signifikante Steigerung der Apoptoserate verglichen mit unstimulierten Zellen. Hingegen führte die Verfettung der primären Hepatozyten mit Ölsäure in unterschiedlichen Konzentrationen zu einer Zunahme der

### 3 ERGEBNISSE

Empfindlichkeit der primären Hepatozyten für Gallensäuren-induzierte Apoptose mit einer Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität um das bis zu 6,8-fache (s. Abbildung 29).



**Abbildung 29. Verfettung von primären Rattenhepatozyten mit Oleic Acid [100 µM - 500 µM] führt zu einer Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität nach Apoptoseinduktion.** 12 Stunden nach Verfettung der Zellen mit 0,1 mM – 0,5 mM Ölsäure (Oleic Acid) wurden die HepG2-Ntcp Zellen für 4 Stunden mit 30 µM bzw. 75 µM GCDCA inkubiert oder nicht stimuliert. Bestimmung der Apoptoserate durch Caspase-3/7-Aktivitätsassay. Mit der Zunahme der Verfettung ist auch eine Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität bei Stimulation mit GCDCA zu sehen. Die Caspase-3/7-Aktivität der nicht verfetteten und nicht stimulierten Zellen wurde auf 1 normiert (MW ± SD, n=3, \*\*p<0,01 vgl. nicht verfettet und GCDCA 30 µM).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Molekulare Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Apoptose in humanen Hepatozyten

Die vorliegende Arbeit untersucht molekulare Mechanismen der durch hydrophobe Gallensäuren induzierten Leberzellschädigung beim Menschen. Hydrophobe Gallensäuren haben eine toxische Wirkung auf Hepatozyten und werden für die irreversible Leberschädigung bei Cholestase hauptverantwortlich gemacht.<sup>137</sup> Für Ausmaß und Progression einer cholestatischen Leberschädigung ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen den Effekten potentiell toxischer, hydrophober und nicht-toxischer, hydrophiler Gallensäuren von Bedeutung.

Bei Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen sind die quantitativ dominierenden hydrophoben Gallensäuren die Glycin- und Taurin-Konjugate der Chenodeoxycholsäure. Dabei überwiegen die Glycin-Konjugate.<sup>65</sup> Der Glycochenodeoxycholsäure wird daher eine besondere Bedeutung für die Pathogenese der cholestatischen Leberschädigung beigemessen.

Die Konzentration der hydrophoben Gallensäuren korreliert positiv mit dem Grad der Leberschädigung während der Cholestase.<sup>79</sup> Hydrophobe Gallensäuren können *in vitro* bei Konzentrationen oberhalb von 100  $\mu\text{M}$  zu einer Schädigung der Zellmembran auf Grund ihrer Detergenzienwirkung führen.<sup>73</sup> Bei geringeren Konzentrationen lösen hydrophobe Gallensäuren *in vitro* Apoptose in Hepatozyten aus.<sup>98,138,139</sup> Auch in Leberproben von PBC-Patienten konnte eine erhöhte Apoptoserate der Hepatozyten nachgewiesen werden.<sup>75</sup> Miyoshi et al. zeigten in Versuchen mit gallengangsligierten Mäusen, dass bei extrahepatischer Cholestase die hepatozelluläre Apoptose die vorherrschende Form des Zelltods ist.<sup>83</sup>

Hydrophobe Gallensäuren aktivieren nach Aufnahme in die Leberzelle molekulare Mechanismen, die den apoptotischen Untergang der Zelle induzieren. Dabei wird auch die Gruppe der Cysteinproteasen (Caspasen) aktiviert, die in einer Vielzahl von Spezies essentiell für den programmierten Zelltod sind.<sup>42</sup> Da die humane Hepatomzelllinie HepG2 keinen effektiven basolateralen Gallensäuretransporter hat, musste sie zunächst stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert werden.<sup>140</sup> Bei der Stimulation der HepG2-Ntcp Zellen mit GCDCA wurden sowohl die Initiatorcaspasen-8 und -9, als auch die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktiviert (s. Abbildung 8). Die aktivierten Initiatorcaspasen-8 oder -9 können direkt die Effektorcaspasen-3 und -7 proteolysieren, die den Zelluntergang induzieren.

Caspase-8 kann auf zweierlei Wege aktiviert werden: durch die Bindung an Todesrezeptoren oder durch die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien.<sup>48</sup>

Die Todesrezeptor-vermittelte Aktivierung von Caspase-8 im DISC-Komplex („death inducing signaling complex“) wurde bereits genau beschrieben. Der Fas-Ligand bindet an den Fas-Rezeptor und induziert mit Hilfe des Adapterprotein FADD die Rekrutierung der Caspase-8 an den membranständigen DISC.<sup>141,142</sup> Die Bindung von zwei oder mehreren Zymogenen der Caspase-8 an den DISC führt zur Autoproteolyse der Caspasen und die aktivierten Caspase-8-Moleküle wandern vom DISC ins Zytosol.<sup>143</sup>

Es kann auch unabhängig vom membranständigen DISC und vom Fas-Rezeptor Caspase-8 prozessiert werden.<sup>144-146</sup> Der Mechanismus, wie zytosolische Caspase-8 durch Cytochrom c aktiviert wird, ist weitgehend unbekannt.

Physiologische Konzentrationen von Gallensäuren können direkt die „mitochondrial permeability transition“ (MPT), die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch die Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren.<sup>88,89</sup>

Auf diese Weise können Gallensäuren unabhängig von Todesrezeptoren Apoptose in Leberzellen auslösen. Kuwana et al. gelang es bereits vor fast zehn Jahren zu zeigen, dass die Aktivität der Caspase-8 abhängig ist von der mitochondrialen Cytochrom c-Freisetzung. Beim Fehlen der Mitochondrien war die proteolytische Aktivität der Caspase-8 deutlich eingeschränkt.<sup>147</sup> Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Caspase-8 postmitochondrial und unabhängig von Todesrezeptoren aktiviert werden kann.<sup>86</sup> Versuche von Schoemaker et al., die primäre Rattenhepatozyten mit einem



## 4 DISKUSSION

---

adenoviralen, dominant-negativen FADD-Expressionsplasmid transfizierten, unterstützen die Hypothese der postmitochondrialen Caspase-8-Aktivierung. Hepatozyten, die mit dem dominant-negativen FADD transfiziert wurden, unterschieden sich hinsichtlich der Aktivität der Caspase-8 und -3 nicht von den mit dem Kontrollplasmid LacZ transfizierten Zellen. Dies zeigt, dass GCDCA unabhängig von FADD Apoptose induzieren kann und dass die Caspase-8 noch auf andere Weise todesrezeptorunabhängig aktiviert wird.<sup>148</sup>

Somit scheint ein noch nicht eindeutig identifiziertes Protein postmitochondrial die Caspase-8 zu aktivieren. Dieser Mediator zwischen Caspase-9 und -8, bzw. zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg könnte die Caspase-6 sein. Diese würde somit die Caspase-8 proteolysieren, die dann wiederum das proapoptotische Protein Bid aktiviert.<sup>49,149,150</sup> Bid ist ein Protein der Bcl-2 Familie, das den extrinsischen mit dem intrinsischen, mitochondrialen Signalweg verbindet. Bid transloziert zu den Mitochondrien und führt mit Hilfe von Bax und Bak zur mitochondrialen Dysfunktion. Dadurch kommt es zur verstärkten Ausschüttung von Cytochrom c und Prozessierung der Caspase-9, die wiederum die erneute Aktivierung der Caspase-6 induzieren könnte und somit Teil eines „Feedbackloop“ wäre.<sup>87,147</sup>

Da die Rolle der Caspase-6 bei der Gallensäuren-induzierten Caspasenkaskade unklar ist, war sie Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit (s. Abbildung 30).

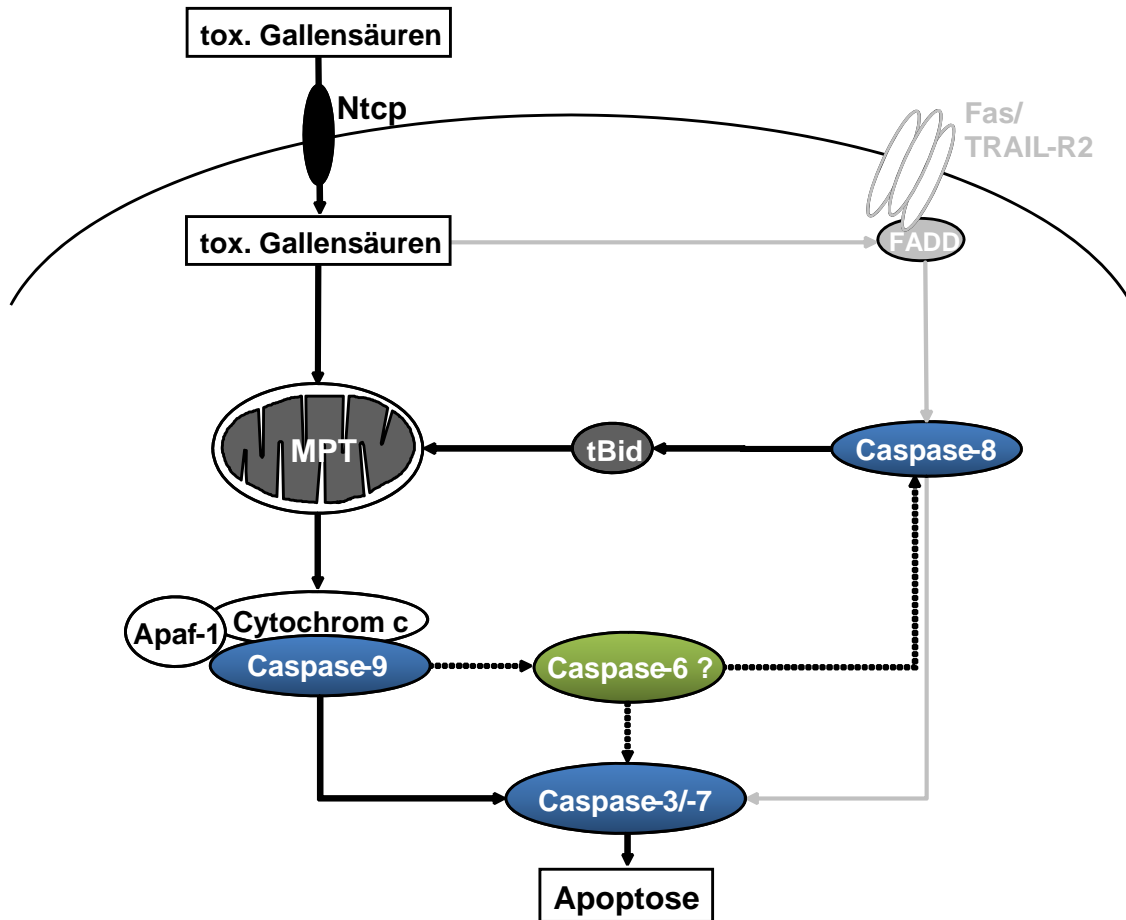


Abbildung 30. Zusammenfassung der molekularen Mechanismen der Gallensäure-vermittelten Apoptose.

#### 4.1.1 Caspase-6 ist Caspase-3, -7 und -8 vorgeschaltet

Die Caspase-6 (Mch2) ist eine Cysteinylnprotease mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, bestehend aus 293 Aminosäuren. Sie setzt sich zusammen aus einer großen Untereinheit von 18-22 kDa, und einer kleinen mit 11-13 kDa.<sup>29,42</sup> Die Bedeutung der Caspase-6 für die Leberzellapoptose wurde bisher nicht untersucht.

Caspase-6 wird gewöhnlich zu den Effektorcaspasen gezählt. Ähnlich wie die anderen Effektorcaspasen-3 und -7 hat auch die Caspase-6 eine kurze Prodomäne. Allerdings scheint sie im Gegensatz zu den Caspasen-3 und -7 nur geringfügig an der Aktivierung der DNA-spaltenden Endonukleasen (DFF45/ICAD, PARP) beteiligt zu sein.<sup>4,151</sup>

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei Inibierung der Caspase-6 in humanen Hepatomzellen die GCDCA-induzierte Caspase-8-Aktivierung signifikant reduziert wird .

Zur spezifischen Herabregulation der Caspase-6 wurde unter anderem die sehr effiziente und zuverlässigen Methode der siRNA angewendet, die sich in vitro sehr gut für die Inhibierung der Expression eines spezifischen Gens eignet.

Mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen reagierten auf die Inkubation mit GCDCA mit einer über 25-fachen Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität, verglichen mit unstimulierten Zellen. Bei Reduktion des Caspase-6-Proteingehalts durch spezifische siRNA wurde die GCDCA-induzierte Apoptoserate signifikant um mehr als 50 % reduziert (s. Abbildung 13). Außerdem wurde durch die Transfektion mit siRNA gegen Caspase-6 die Aktivitäten der Caspasen-3, -7 und -8, verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen, auf mehr als die Hälfte reduziert. Besonders die aktive Caspase-8 war in den mit siRNA gegen Caspase-6 transfizierten Zellen nur noch sehr schwach nachweisbar (s. Abbildung 14). Übereinstimmende Ergebnisse erhielten wir auch bei Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure TLCA.

Dies macht deutlich, dass die Caspase-6 der Caspase-8 in der Kaskade unmittelbar vorgeschaltet sein muss und für die Gallensäuren-induzierte Apoptose von essentieller Bedeutung ist.

Außerdem konnte in Jurkatzelleextrakten nachgewiesen werden, dass die Caspase-6 der direkte Aktivator der Caspase-8 im Cytochrom-c-induzierten Apoptosesignalweg ist.<sup>87</sup> Die Versuche wurden an zellfreien Extrakten aus Jurkat Zellen durchgeführt, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspasenkaskade aktiviert wurde. Bei der Jurkat-Zelllinie handelt es sich um eine humane T-Zelllinie, die wie Hepatozyten zu den Typ-II-Zellen gezählt werden.<sup>152</sup> In Typ-II-Zellen ist die Caspase-8-Aktivierung und DISC schwach ausgeprägt und die Apoptoseinduktion ohne Mitochondrien nicht möglich.<sup>4</sup>

Die Ergebnisse konnten in intakten Zellen, in denen die Komplexität der Signalwege viel größer ist, bestätigt werden. In COS-7-Zellen konnte bei Inhibierung der Caspase-6 ebenfalls nur vermindert aktive Caspase-8 nachgewiesen werden.<sup>87</sup> Bei der COS-7-Zelllinie handelt es sich um eine etablierte Fibroblasten-Zelllinie, die 1981 aus Nierengewebe von grünen Meerkatzen (*Ceropithecus aethiops*) gewonnen wurde. Die

COS-7 Zellen wurden dazu mit an zwei unterschiedlichen Punkten mutierten Caspase-6-Molekülen, Kontrollvektoren oder Wildtyp-Caspase-6-Molekülen transfiziert. Die mit Kontrollvektor oder Wildtyp-Caspase-6 transfizierten Zellen starben schneller als Zellen die mutierte Caspase-6 exprimierten. Die Proteolyse der Caspase-8 war in den Caspase-6-mutierten Zellen stark verzögert.<sup>87</sup>

Slee et al. konnten ebenfalls in Jurkatzellextrakten nachweisen, dass Cytochrom c eine Caspasenkaskade in Gang setzt, in der es zur Aktivierung von Caspase-2, -3, -6, -7, -8 und -9 kommt. In zellfreien Extrakten ohne Caspase-9 konnte keine der Caspasen aktiv nachgewiesen werden. Das Fehlen der Caspase-6 verhinderte die Proteolyse der Caspase-8 und -10, die Caspasen-3, -7 und -9 blieben allerdings unbeeinflusst.<sup>144</sup> Erklärbar ist dies durch das Fehlen des Feedbackloops in den zellfreien Jurkatextrakten, da die Mitochondrien fehlen. Daher hatte das Fehlen der Caspase-6 keinen Einfluss auf die Aktivität der Caspase-9. Im Widerspruch zu unseren Ergebnissen steht allerdings, dass Caspase-3 und -7, durch das Fehlen der Caspase-6, unbeeinflusst blieben. In humanen Hepatomzellen war bei Reduktion des Caspase-6-Proteingehalts eine signifikante Reduktion der GCDCA-induzierten Aktivität der Caspase-3 und -7 zu sehen (s. Abbildung 13 und 14).

Die Stimulation der HepG2-Ntcp Zellen mit der hydrophoben Gallensäure GCDCA zeigte außerdem, dass die Caspase-8 deutlich später aktiviert wird als die Caspase-6. Die aktive Caspase-9 war als erste Caspase im Western Blot nachweisbar. Dies bestätigt, dass sie bei der Gallensäuren-induzierten Apoptose als erste Caspase aktiviert wird. Um eine Aktivierung der Caspase-8 nachweisen zu können, bedurfte es hingegen der längsten Stimulationszeit. Während im Western Blot die aktiven Caspasen-3, -6 und -7 bereits nach einer Stimulationszeit von ½-Stunde nachweisbar waren, und nach 2 Stunden ihre maximale Aktivität erreicht hatten, konnte die aktive Caspase-8 erst eine Stunde nach Stimulationsbeginn nachgewiesen werden und ihre Aktivität nahm bis 4 Stunden danach stetig zu.

Auch Slee et al. konnten in Jurkatzellextrakten zeigen, dass die Cytochrom c-induzierte Prozessierung der Caspase-8 verglichen mit den anderen Caspasen verspätet erfolgte.<sup>144</sup>

Ein anderes Ergebnis lieferte die Inkubation mit anderen apoptotischen Stimuli, wie TNF- $\alpha$  und Actinomycin D oder Etoposid. Bei beiden Stimuli blieb die Apoptoserate durch das Ausschalten der Caspase-6 in den humanen Hepatomzellen unbeeinflusst.

Obwohl der Western Blot der proteolysierten Caspase-6 zeigte, dass in den spezifisch gegen Caspase-6 transfizierten Zellen kaum Caspase-6 vorhanden war, konnte bei Stimulation mit TNF- $\alpha$ - und Actinomycin D trotzdem aktive Caspase-8 nachgewiesen werden (s. Abbildung 16). Die Apoptoserate blieb von der Reduktion des Caspase-6-Proteins unbeeinflusst (s. Abbildung 17). Dies impliziert, dass bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Actinomycin D Apoptose unabhängig von Caspase-6 induziert wird. Bei Aktivierung des extrinsischen Reaktionswegs durch TNF- $\alpha$  spielt somit die Caspase-6 keine entscheidende Rolle. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei Aktivierung des extrinsischen Reaktionsweg die Caspasen-3, -6 und -7 direkt von Caspase-8 aktiviert werden. Bei Aktivierung des extrinsischen Reaktionsweg reicht daher die Inhibierung der Caspase-6 nicht aus, um die Apoptose der Zelle zu verhindern.

Auch bei Stimulation mit Etoposid, konnte nur ein geringfügiger, nicht signifikanter Unterschied zwischen kontrolltransfizierten Zellen und mit siRNA gegen Caspase-6 transfizierten Zellen verzeichnet werden. Die Aktivitäten der Caspase-3, -7 und -8 wurden durch die Reduktion des Caspase-6-Proteingehalts bei Stimulation mit Etoposid nicht signifikant reduziert (s. Abbildung 16 und 17). Etoposid induziert wie hydrophobe Gallensäuren Apoptose über den intrinsischen Signalweg. Dies impliziert, dass der Effekt der Caspase-6 gallensäurenspezifisch ist und nur für die Gallensäuren-induzierte Apoptose von Bedeutung ist.

Aber auch in Caspase-6-siRNA-transfizierten Zellen war bei GCDCA-Stimulation weiterhin Apoptose nachweisbar. Ein Grund hierfür könnte sein, dass immer noch geringe Mengen aktiver Caspase-6 vorhanden waren, da die Reduktion des Proteingehaltes durch siRNA nie vollständig ist. Eine weitere Erklärung ist der über AIF (Apoptosis inducing Factor)-induzierte Zelltod, der Caspase-unabhängig ist. AIF wird von den Mitochondrien während der Apoptose freigesetzt, transloziert dann zum Nukleus, wo es die Kondensation des Chromatin und die DNA-Fragmentation induziert.<sup>35</sup> Außerdem konnte die Caspase-8 auch über den Todesrezeptorvermittelten, extrinsischen Weg aktiviert werden, da dieser durch das Ausschalten der Caspase-6 nicht inhibiert wurde. Allerdings impliziert die signifikante Reduktion der Caspase-8-Aktivität nach

Reduktion des Caspase-6-Proteins, dass bei Gallensäuren-induzierter Apoptose der extrinsische Signalweg nur zur Verstärkung des apoptotischen Signals beitragen kann, aber nicht essentiell für die Aktivierung der Caspase-8 oder für den Gallensäuren-induzierten Tod der Zelle ist. Desweiteren konnten die Caspasen-3 und -7 auch durch Caspase-9 aktiviert werden. Die signifikante Reduktion der Aktivitäten der Effektorcaspasen-3 und -7 bei Reduktion des Caspase-6-Gehalts der Zelle deutet aber auf die essentielle Bedeutung des sog. Feedbackloops hin. Die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 durch Caspase-9 selbst scheint somit nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die siRNA-Ergebnisse wurden durch Versuche mit dem spezifischen Caspase-6-Inhibitor Z-VEID-FMK bestätigt. Dieses Molekül ist durch die Benzyloxycarbonyl-Gruppe gut zellpermeabel und bindet über die Aminosäuren direkt an das katalytische Zentrum der Caspase-6, welches daraufhin inaktiviert wird.

Versuche an HepG2-Ntcp Zellen zeigten, dass die optimale Konzentration des Inhibitors 20  $\mu\text{M}$  beträgt. Niedrigere Konzentrationen konnten die Caspase-6 nicht ausreichend hemmen (s. Abbildung 9). Konzentrationen über 50  $\mu\text{M}$  hingegen können auch unspezifisch andere Caspasen hemmen. Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit GCDCA unter gleichzeitiger Zugabe von Z-VEID-FMK zeigten ein ähnliches Ergebnis wie die siRNA-Versuche. Ohne aktive Caspase-6 war die Proteolyse der Caspasen-3, -7 und -8 deutlich geschwächt, während die Aktivität der Caspase-9 wieder nur geringfügig beeinflusst wurde (s. Abbildung 9). Auch die Apoptoserate war bei inhibierter Caspase-6 signifikant reduziert (s. Abbildung 10).

Auffällig war, dass bei Inhibierung der aktiven Caspase-6 im Western Blot gegen aktivierte Caspase-3 zunächst nur die untere (17 kDa) der beiden Banden verschwand. Das kleinere Fragment (17kDa) der proteolysierten Caspase-3 entsteht durch Autoproteolyse der großen Untereinheit, die vor allem nach Spaltung der Caspase-3 durch Caspase-8 und -10 induziert wird. Die obere 19 kDa Bande repräsentiert die große Untereinheit der Caspase-3 ohne Autoproteolyse.<sup>40,134,153</sup> Da zunächst die 17 kDa-Bande der Caspase-3 nach Inhibierung der Caspase-6 verschwand, wird zum einen indirekt gezeigt, dass das Ausschalten der Caspase-6 auch die Caspase-8 beeinflusst. Zum anderen wird deutlich, dass die Aktivierung der Caspase-3 durch andere Caspasen, als Caspase-8 oder -10 von größerer Bedeutung ist, da es einer höheren Inhibitorkonzentration bedarf, um diese zu unterdrücken (s. Abbildung 9).

Die siRNA- und Inhibitorexperimente gegen Caspase-6 haben gezeigt, dass die Caspase-6 bei Gallensäuren-induzierten Apoptose keine reine Effektorcaspase ist, die durch Proteolyse nukleärer Proteine den apoptotischen Zelltod einleitet. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Caspase-6 bei GCDCA-induzierter Apoptose sowohl der Initiatorcaspase-8 als auch den Effektorcaspasen-3 und -7 vorgeschaltet ist und somit direkt an der Regulation der Apoptose beteiligt ist.

### **4.1.2 Caspase-6 ist Caspase-9 nachgeschaltet**

Die proteolysierte Form der Caspase-9 wurde durch die Reduktion des Caspase-6 Proteingehaltes weniger stark beeinflusst als die aktiven Formen der anderen Caspasen. Zudem konnte in Caspase-9-defizienten humanen Hepatomzellen eine deutliche Reduzierung der Caspase-6-Aktivität bei GCDCA-induzierter Apoptose nachgewiesen werden. Versuche mit dem spezifischen Caspase-9-Inhibitor Z-LEHD-FMK zeigten, dass bei blockierter Caspase-9 die Aktivierung der Caspase-6 bei GCDCA-Stimulation der HepG2-Ntcp Zellen stark gemindert war (s. Abbildung 18). Gleiches zeigte sich in den siRNA-Experimenten. Durch die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen Caspase-9 war der Proteingehalt der Caspase-9 im Western Blot deutlich reduziert (s. Abbildung 19). Das Signal der aktiven Caspase-6 konnte bei GCDCA-Stimulation der mit siRNA gegen Caspase-9 transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nur noch schwach nachgewiesen werden (s. Abbildung 20).

Daher muss die Caspase-9 der Caspase-6 vorgeschaltet sein. Die trotzdem schwache Reduktion der Caspase-9-Aktivität in Caspase-6-defizienten Zellen ist durch die Unterbindung des Feedbackloops zu erklären. Durch die Inhibierung der Caspase-6 wird mit der Hemmung der Aktivierung der Caspase-8 auch die Bid-abhängige Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die weitere Aktivierung von Caspase-9 unterbunden (s. Abbildung 31).

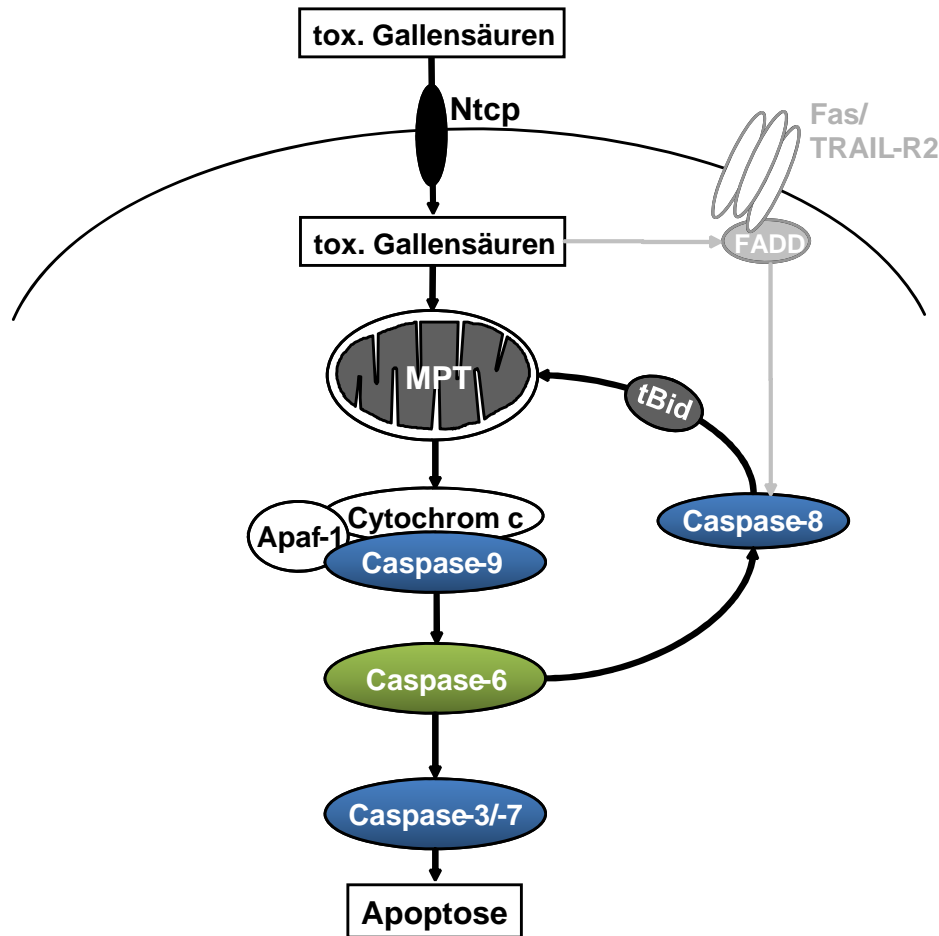


Abbildung 31. Modell der GCDCA-vermittelten Apoptoseinduktion

#### 4.1.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass Caspase-6 nicht, wie bisher angenommen, eine reine Effektorcaspase ist, die nach Aktivierung durch Initiatorcaspasen Zellbestandteile abbaut, sondern dass sie maßgeblich bei der Gallensäuren-induzierten Apoptose an der Regulation und Aktivierung der Effektorcaspasen beteiligt ist. Die Aktivität der Caspase-8 war in Caspase-6-defizienten Zellen gleichermaßen reduziert wie die Aktivität der Effektorcaspasen-3 und -7. Dies weist darauf hin, dass die Caspase-8 der Caspase-6 nachgeschaltet ist und ihre Aktivierung teilweise von der Aktivität der Caspase-6 abhängig ist. Für die durch Gallensäuren induzierte Apoptose in Hepatozyten ist die Caspase-6 von essentieller Bedeutung. Dabei handelt es sich um einen gallensäurenspezifischen Effekt. Die Stimulation Caspase-6-defizienter Zellen mit



## 4 DISKUSSION

---

anderen Apoptoseinduktoren hatte keinerlei Einfluss auf die hepatozelluläre Apoptoserate.

### 4.2 Gallensäuren-induzierte Apoptose in steatotischen Hepatozyten

Steatose ist das charakteristische Merkmal der „Non Alcoholic Fatty Liver Diseases“ (NAFLD). Im Normalfall wird die Steatose gut toleriert und in milden Fällen ist die Verfettung sogar reversibel und hat keinerlei nachteiligen Effekt auf das Organ. In schwerwiegenden Fällen kommt es allerdings zur Progression der Steatose, Lipotoxizität, Entzündung und Schädigung der Zellen bis hin zu Fibrose und Zirrhose.<sup>154-156</sup>

Unklar ist, warum bei einigen Patienten die Steatose stabil bleibt und nicht fortschreitet, und andere Patienten eine Steatohepatitis (sog. NASH, non-alcoholic steatohepatitis), Fibrose oder sogar Zirrhose entwickeln. Heute ist bekannt, dass es mehrere sogenannter „hits“ für die Progression einer NAFLD bedarf. Dazu werden die Insulinresistenz, Apoptose, oxidativer Streß, mitochondriale Dysfunktion und Adipokine gezählt.<sup>121,157</sup>

Hydrophobe Gallensäuren können nachweislich sowohl oxidativen Stress und MPT<sup>88,89</sup> als auch den apoptotischen Untergang der Leberzellen induzieren und könnten somit einen möglichen „hit“ darstellen.<sup>78,80,82-84</sup> Hepatozelluläre Apoptose kann die Entzündung der Leber, die Entwicklung einer Fibrose oder Zirrhose initiieren und zur Progression einer chronischen Lebererkrankung beitragen.<sup>158</sup> Sie spielt bei vielen chronischen Lebererkrankungen, wie der viralen oder alkoholischen Hepatitis, Morbus Wilson oder der PBC eine wichtige Rolle. Auch in den Lebergewebebeobachtungen von NASH-Patienten konnte eine erhöhte Apoptoserate der Hepatozyten und eine gesteigerte Aktivierung von Caspase-3 und -7 festgestellt werden. Diese korrelierten mit den biochemischen und histopathologischen Werten der Leberschädigung und dem Fibroestadium der Patienten.<sup>119,159,160</sup>

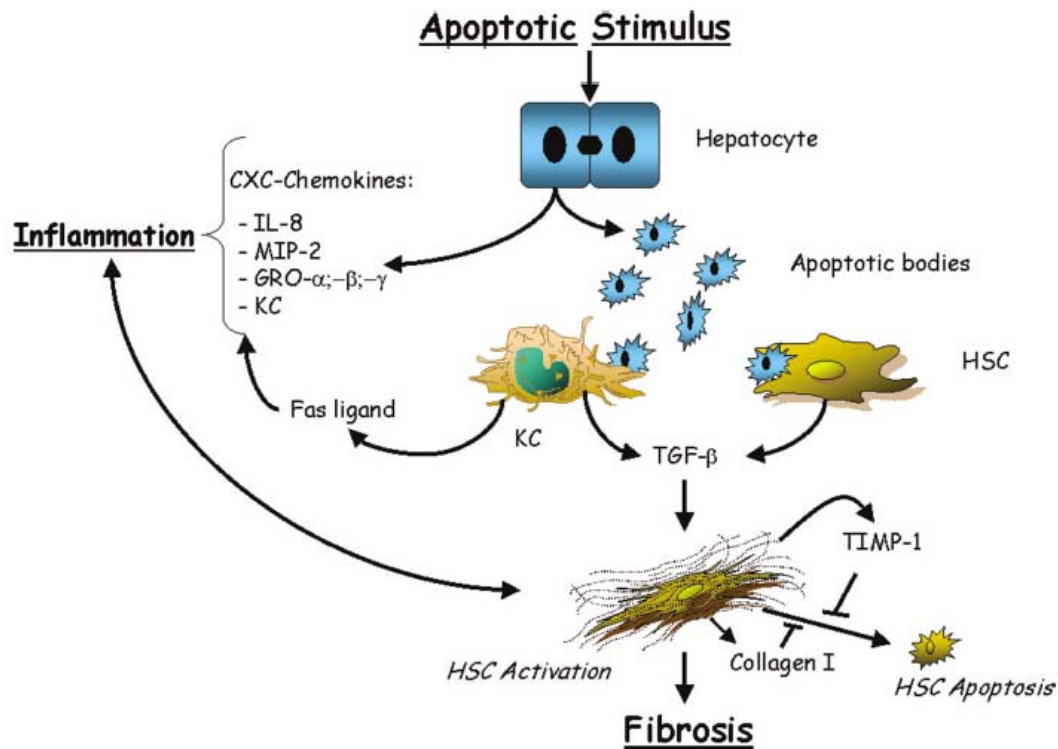
Der Zusammenhang von Apoptose, Entzündung und Fibrose wird bereits seit längerem untersucht. Canbay et al. zeigten im Model der gallengangsligierten Maus, dass durch Inhibierung der Apoptose die Fibrogenese der Leber reduziert wurde.<sup>161</sup> In anderen Experimenten entwickelten Mäuse, denen intraperitoneal Fas-Agonisten verabreicht wurden, durch die Induktion von Apoptose fulminante hepatische Schäden mit ausgeprägter Entzündung und Fibrose.<sup>20</sup>

## 4 DISKUSSION

---

Ein möglicher Mechanismus, wie hepatozelluläre Apoptose die Entwicklung einer Fibrose initiiert, ist dass durch die Phagozytose der apoptotischen Körper durch die „hepatic stellate cells“ (HSC) die fibrogenetische Aktivität dieser Zellen aktiviert wird.<sup>3,162</sup> Wenn das Ausmaß der Apoptose die Kapazität der Phagozytose übersteigt, kommt es zur spontanen Auflösung der apoptotischen Körper („apoptotic bodies“) und zur Freisetzung ihrer Inhaltsstoffe, die einen Gewebsschaden induzieren, der wiederum eine inflammatorische Antwort auslöst.<sup>137</sup> Jaeschke et al. demonstrierten, dass die hepatozelluläre Apoptose ein potenter Stimulus für die transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten in das Gewebe ist.<sup>163-165</sup> Außerdem wurde gezeigt, dass die Inhibierung der hepatozellulären Apoptose während der Leberschädigung die Transmigration der Neutrophilen in die Leber blockiert.<sup>163,164,166,167</sup>

Die Phagozytose der apoptotischen Körper durch Kupferzellen und „Hepatic stellate cells“ (HSCs) stimuliert direkt über die Generierung des „transforming growth factor (TGF)- $\beta$ “ die Fibrogenese.<sup>168-170</sup> TGF- $\beta$  ist ein potenter Inhibitor der T-Zell Funktion und ein starker, fibrinogener Faktor, der die Akkumulation extrazellulärer Matrix in der Leber induziert.<sup>171,172</sup> Die Verbindung zwischen Apoptose und Fibrose ist bidirektional. So führt die fibrotische Gewebsschädigung zur gesteigerten Genexpression und Produktion des proapoptotischen Fas/Fas L.<sup>173,174</sup> (s. Abbildung 32)



**Abbildung 32. Schematische Darstellung der Verbindung zwischen hepatozellulärer Apoptose, Entzündung und Fibrose.** Proapoptische Stimuli induzieren Apoptose in den Leberzellen. Durch die Freisetzung von Lipidsignalen werden die apoptotischen Zellen von Kupferzellen und „hepatic stellate cells“ (HSC) phagozytiert. Die Phagozytose der apoptotischen Körper fördert die Expression profibrotischer Gene und Todesliganden (z. B. Fas). Die persistierende Aktivierung dieser Zellen induziert weitere Apoptose, die die hepatische Entzündung mit der Bildung von CXC-Chemokinen (Interleukin-8, macrophage inflammatory protein-2, growth-related oncogene- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , CXC Ligand-1) und weitere HCS-Aktivierung induziert. Antiapoptische Signale, wie „tissue inhibitor of metalloproteinase-1“ und „collagen I“, das während der Fibrogenese akkumuliert, machen aktivierten HSCs resistent für apoptotische Stimuli und führen dazu, dass weiter Narbengewebe akkumuliert.<sup>3</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang von Steatose und Gallensäuren-induzierter Apoptose untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Steatose die Empfindlichkeit der Hepatozyten gegenüber Apoptose, induziert durch niedrig mikromolare Konzentrationen proapoptischer Gallensäuren, gesteigert wird.

### 4.2.1 In vitro Modell der Gallensäuren-induzierten Apoptose bei Steatose

Es existieren einige Leberzellkulturmodelle für die Untersuchung von Steatose<sup>175-177</sup> und zur Untersuchung von Gallensäuren-induzierter Apoptose.<sup>78,80-82</sup> Allerdings gibt es derzeit noch kein Zellkulturmodell zur Untersuchung der Gallensäuren-induzierter Apoptose bei gleichzeitiger Steatose.

Kobak et al. entwickelten ein in vitro Modell zur Untersuchung von Nekrose und Steatose, in dem sie aus fa/fa-Ratten gewonnene Hepatozyten, die eine Mutation im Leptin-Gen aufweisen, mit Gallensäuren stimulierten.<sup>73</sup> Wie dieses Experiment wurden bisher die meisten Untersuchungen zur Pathogenese der NASH anhand von genetischen Tiermodellen, die defizient für Leptin oder für den Leptinrezeptor sind (z. B. ob/ob-Mäuse oder fa/fa-Ratten), durchgeführt.<sup>178</sup> NAFLD ist beim Menschen meist mit einer Hyperinsulinämie und einer Hyperleptinämie assoziiert.<sup>157,179</sup> Auch wenn die Mechanismen, die zur Akkumulation von Fett in der Leber führen, nicht komplett verstanden sind, scheint doch die Resistenz gegen die antisteatotische Wirkung von Leptin und Insulin eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>157,180</sup> Außerdem soll Leptin auch die Progression von hepatischer Steatose zu einer hepatischen Steatohepatitis mit beeinflussen und zudem auch in Zusammenhang mit hepatischer Fibrogenese stehen.<sup>181,182</sup> Die Leptin- bzw. Leptinrezeptor-defizienten Tiere entwickeln zwar einige der charakteristischen Merkmale der NAFLD, wie Insulinresistenz, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und eine Fettleber, allerdings wird ein offensichtlich auch an der Pathogenese mitbeteiligter Faktor, das Leptin, bei den Untersuchungen nicht berücksichtigt.<sup>127-129</sup>

Deshalb haben wir in dieser Arbeit die verfetteten Zellen nicht aus Leptin-defizienten Tieren gewonnen, sondern HepG2-Ntcp Zellen oder primäre Rattenhepatozyten erst in der Zellkultur durch die Inkubation mit langkettigen Fettsäuren verfettet.

Bei NASH-Patienten wurden vermehrt frei zirkulierende Fettsäuren beobachtet, deren Serumspiegel mit dem Schweregrad der Steatohepatitis korrelierten.<sup>122</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die freien Fettsäuren (FFA) in hohen Konzentrationen potente zelluläre Toxine sind und Lipoapoptose induzieren können.<sup>176,183</sup>

Durch die dosierte Verfettung der Hepatozyten mit freien Fettsäuren versuchten wir Bedingungen zu schaffen, die denen in vivo nahe kommen, mit minimal toxischen und

apoptotischen Effekten der Fettsäuren selbst. Durch diese Vorgehensweise gelang es die apoptotische Wirkung der Gallensäuren bei Steatose von den zytotoxischen Effekten der Fettsäuren zu differenzieren.

Araya et al. untersuchten das Verhältnis der unterschiedlichen langkettigen Fettsäuren in Lebergewebe von gesunden Probanden und von NAFLD-Patienten. Palmitinsäure (C16:0) und Ölsäure (C18:1) waren die am häufigsten vorkommenden FFA in Lebertriglyceriden gesunder Probanden und NAFLD-Patienten.<sup>136</sup> Auch in Mäusen<sup>184</sup> und Kühen<sup>185</sup> mit hepatischer Steatose konnte eine verstärkte Akkumulation von Palmitinsäure und Ölsäure in der Leber nachgewiesen werden. Daher inkubierten wir HepG2-Ntcp Zellen für 24 Stunden mit der gesättigten Palmitinsäure, der einfach ungesättigten Ölsäure, oder einer Kombination von beiden. Gesättigte (Palmitinsäure) und ungesättigte (Ölsäure) langkettige Fettsäuren wiesen unterschiedliche toxische und apoptotische Effekte auf (s. Abbildung 25). Mahli et al. zeigten, dass gesättigte Fettsäuren (z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure) zytotoxischer sind, als einfach ungesättigte Fettsäuren (z. B. Ölsäure, Palmitoleinsäure) bei vergleichbarer Induktion zellulärer Steatose.<sup>176</sup> Dies konnten wir bestätigen, da auch bei uns die Palmitinsäure (gesättigt) bei gleicher Konzentration zytotoxischer war als die Ölsäure (einfach ungesättigt). Unsere Beobachtungen decken sich mit solchen in anderen Zelltypen, wie  $\beta$ -Pankreaszellen, Myokardzellen, Skelettmuskelzellen, Neuronen und Endothelzellen.<sup>186,187</sup> Der apoptotische Effekt der Palmitinsäure konnte in unseren Untersuchungen durch die Zugabe der gleichen Menge Ölsäure auf die Hälfte reduziert werden (s. Abbildung 25). Die Daten zeigen, dass die verschiedenen Fettsäuren sich in ihrem toxischen Potential auch in humanen Leberzellen deutlich unterscheiden. Es wäre interessant zu untersuchen, ob das FFA-Profil in Serum und/oder Lebergewebe Aufschluss über den Schweregrad einer Steatohepatitis bei NASH-Patienten gibt.<sup>176</sup>

Um Effekte potentieller Toxine auf steatotische Hepatozyten zu untersuchen, erscheint Ölsäure als Induktor einer Steatose geeignet, da sie in den verwendeten Konzentrationen keine oder nur eine sehr geringe apoptotische und zytotoxische Wirkung auf die Zellen hat. Auch bei einer Fettleber haben die freien Fettsäuren alleine keinen apoptotischen Effekt auf die Leberzellen. Damit lässt sich anhand dieses Modells die Bedeutung der

Apoptose für die Entwicklung einer Steatohepatitis bei vorbestehender Steatosis hepatis untersuchen (s. Abbildung 25 und 28 (A)).

### **4.2.2 Gesteigerte Empfindlichkeit steatotischer Hepatozyten gegenüber Gallensäuren-induzierter Apoptose**

Bei Inkubation der steatotischen oder nichtverfetteten humanen HepG2-Ntcp Zellen für 4 Stunden mit hydrophoben Gallensäuren zeigte sich eine gesteigerte Empfindlichkeit der verfetteten Zellen für die Gallensäuren-induzierte Apoptose. Die steatotischen Zellen zeigten eine ca. dreifach erhöhte Apoptoserate bei Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren (GCDCA oder TLCA) gegenüber nichtverfetteten Zellen (s. Abbildung 27). Um die in vivo Bedingungen hinsichtlich der Gallensäureaufnahmekapazität besser widerzuspiegeln, führten wir die Experimente auch in frisch isolierten primären Rattenhepatozyten durch. Wir konnten in primären Hepatozyten wie in humanen HepG2 Zellen zeigen, dass die Verfettung der Zellen durch die Inkubation mit FFA die Empfindlichkeit gegenüber Gallensäuren-induzierten Apoptose steigert (s. Abbildung 28 und 29).

Kobak et al. beobachteten im Unterschied zu unseren Untersuchungen, dass bei Stimulation steatotischer Hepatozyten mit GCDCA Nekrose die vorherrschende Form des Zelltods ist. Sie verzeichneten eine Abnahme der Apoptoserate und Zunahme der Nekroserate in aus Zuckerratten isolierten Hepatozyten bei Stimulation mit GCDCA.<sup>73</sup> Ein Grund hierfür könnte sein, dass Kobak et al. in ihrer Studie die hydrophoben Gallensäuren in sehr hohen Konzentrationen bis zu 1000  $\mu\text{M}$  einsetzten. Hydrophobe Gallensäuren, wie GCDCA, induzieren in vitro ab Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$  fast ausschließlich Nekrose.<sup>73,188</sup> Deshalb setzten wir die hydrophoben Gallensäuren in sehr niedrigen Konzentrationen ein ( $< 50 \mu\text{M}$ ). 10  $\mu\text{M}$  GCDCA konnte in nicht verfetteten HepG2-Ntcp Zellen keine signifikante Apoptose induzieren. Allerdings konnte durch die Verfettung der Zellen für 24 h mit 500  $\mu\text{M}$  Ölsäure die Apoptoserate bei Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  GCDCA um das 2,8-fache gesteigert werden (s. Abbildung 26). Dies bedeutet, dass niedrig mikromolare Gallensäurenkonzentrationen, die auf unverfettete Hepatozyten keinerlei apoptotische Wirkung haben, in gleicher Konzentration in verfetteten Zellen Apoptose induzieren können. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass durch Steatosis die

Empfindlichkeit der Hepatozyten gegenüber der apoptotische Wirkung hydrophober Gallensäuren gesteigert wird.

### **4.2.3 Zusammenfassung**

Die Ergebnisse zeigen, dass durch FFA-induzierte Steatose die Empfindlichkeit von Hepatozyten gegenüber Apoptose, induziert durch niedrig mikromolare Konzentrationen proapoptotischer Gallensäuren, gesteigert wird. GCDCA induzierte in steatotischen Hepatozyten signifikant Apoptose in Konzentrationen, die auf nicht steatotische Hepatozyten keinerlei toxische Wirkung hatten. Die bei Steatosis vermehrt induzierte Apoptose könnte ursächlich dafür sein, dass geringe Mengen akkumulierender Gallensäuren ausreichen, um die Progression einer zunächst harmlosen NAFLD bis hin zu einer NASH, Fibrose oder Zirrhose zu induzieren. Die molekularen Mechanismen, die dieser erhöhten Empfindlichkeit steatotischer Leberzellen für Gallensäuren-induzierter Apoptose zugrunde liegen, bedürfen weiterer Aufklärung.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Apoptose ist ein entscheidender Mechanismus der hepatozellulären Schädigung bei cholestatischen Lebererkrankungen wie der primär biliären Zirrhose. Intrazellulär akkumulierende hydrophobe Gallensäuren können in Leberzellen Apoptose und damit den Untergang der Zellen induzieren. Die zur Apoptose führenden intrazellulären Mechanismen sind unvollständig geklärt und werden teils kontrovers diskutiert.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Todesrezeptor-unabhängige Aktivierung der Caspase-6 essentiell für die Gallensäuren-induzierte Apoptose in Leberzellen ist. Die Arbeit zeigt außerdem, dass Steatose zu einer erhöhten Empfindlichkeit für Apoptose in menschlichen Leberzellen bei bereits mikromolaren Konzentrationen hydrophober Gallensäuren führt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Caspase-6 für die Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA)-induzierte Apoptose in humanen Hepatomzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in Hepatomzellen die Gallensäuren-induzierte Apoptose durch Inhibierung der Caspase-6 deutlich reduziert wird. Dabei waren der Effekt einer Reduktion des Caspase-6-Proteingehalts mittels siRNA und der Blockade der Caspase-6 mit dem spezifischen Inhibitor Z-VEID-FMK vergleichbar. Das Ausschalten der Caspase-6 führte zur deutlichen Reduktion der Aktivitäten der Caspase-3, -7 und -8, die Proteolyse der Caspase-9 wurde hingegen nur geringfügig beeinflusst. Dies verdeutlicht, dass in humanen Hepatomzellen die Caspase-6 essentiell für die Gallensäuren-induzierte Apoptose ist, und sowohl den Effektorcaspasen-3 und -7, als auch der Initiatorcaspase-8 vorgeschaltet ist. Durch Inhibierung der Caspase-9 in humanen Hepatomzellen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivierung der Caspase-6 abhängig ist von der Aktivierung der Caspase-9.

Caspase-6 scheint zum einen die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 zu induzieren und zum anderen nach Induktion des intrinsischen Reaktionswegs die Aktivierung der

Caspase-8 zu vermitteln. Caspase-6 induziert damit einen sog. „Feedback Loop“, der über die Aktivierung von Caspase-8 und tBid zur Amplifizierung des mitochondrialen Signalwegs und vermehrten Aktivierung der Caspase-9 führt. Durch diese Rückkopplung wird die Apoptoserate zusätzlich verstärkt. Dieser Effekt ist Gallensäuren-spezifisch. Die durch Caspase-6 vermittelte Apoptoserate blieb bei anderen Apoptosestimuli durch das Ausschalten der Caspase-6 unbeeinflusst. Zukünftige in vivo Studien sollten darauf zielen, die Bedeutung der Caspase-6 für das Ausmaß von Gallensäuren-induzierter Leberschädigung weiter zu klären. Da Caspase-6 offensichtlich von großer Bedeutung für die Gallensäuren-induzierte Apoptose, nicht aber für Apoptose durch andere Stimuli ist, könnte die Caspase-6 ein Angriffspunkt für die Therapie Gallensäuren-induzierter Leberschädigung sein.

Im zweiten Teil wurde die Empfindlichkeit steatotischer Leberzellen gegenüber potentiell toxischen Gallensäuren untersucht. Dazu musste zunächst ein in vitro Modell der Gallensäuren-induzierten Apoptose bei steatotischen Leberzellen entwickelt werden. Hierzu wurde die humane Hepatomzelllinie HepG2-Ntcp mit freien Fettsäuren inkubiert. Die apoptotischen Effekte der hydrophoben Gallensäure GCDCA wurden dann in den steatotischen Leberzellen untersucht. Durch die Inkubation der HepG2-Ntcp Zellen mit ungesättigter Ölsäure oder gesättigter Palmitinsäure ließ sich auch bei niedrigen Fettsäurekonzentrationen eine gleichmäßige Steatose der Zellen erreichen. Es konnte gezeigt werden, dass weder GCDCA noch die Fettsäuren alleine in niedrigen Konzentrationen einen apoptotischen Effekt auf die Zellen hatten. Wurden allerdings die mit mikromolaren Konzentrationen verfetteten Zellen gleichzeitig mit niedrig mikromolaren Konzentrationen von GCDCA stimuliert steigerte sich die Apoptoserate in den verfetteten Zellen um mehr als das 4-fache. Zudem nahm die Apoptoserate bei Stimulation mit gleichbleibender GCDCA-Konzentration proportional mit dem Grad der Verfettung der Zellen zu. Diese Effekte beobachteten wir sowohl in der humanen Hepatomzelllinie HepG2-Ntcp als auch in primären Rattenhepatozyten.

Apoptose, induziert durch geringste Mengen in der Leber akkumulierter Gallensäuren, könnte somit ein möglicher „Hit“ bei der Entwicklung einer progredienten Leberschädigung im Rahmen einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung sein. Ob eine anti-apoptotische Therapie zukünftig eine sinnvolle Behandlungsmöglichkeit für NASH-Patienten darstellen könnte, werden weitere Untersuchungen erweisen müssen.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                  |   |
|------------------|---|
| 5-ASA            | 5-Aminosalizylsäure                               |
| A                | Adenin (Nukleinsäure)                             |
| A                | Alanin (Aminosäure)                               |
| ABC              | ATP binding cassette                              |
| Act D            | Actinomycin D                                     |
| AIF              | apoptosis-inducing factor                         |
| Apaf             | apoptotic protease-activating factor              |
| ASH              | alcoholic steatohepatitis                         |
| ATP              | Adenosin-5`-Triphosphat                           |
| Bad              | Bcl-2 agonist of cell death                       |
| Bak              | Bcl-2 agonist/killer                              |
| BAREs            | bile acid responsive elements                     |
| Bax              | Bcl-2 associated X-factor                         |
| Bcl              | B-cell lymphoma                                   |
| BDL              | bile duct ligation                                |
| BH-              | Domänen Bcl-2 homology domains                    |
| Bid              | BH3-interacting DD agonist                        |
| Bik              | Bcl-2 interacting killer                          |
| bp               | Basenpaar   |
| Brag             | brain-related apoptosis gene                      |
| BRIC             | benigne rezidivierende intrahepatische Cholestase |
| BSA              | Bovines Serumalbumin                              |
| Bsep             | bile salt export pump                             |
| C                | Cytosin   |
| CA               | Cholsäure   |
| Ca <sup>2+</sup> | Kalzium   |
| CAD              | caspase-activated DNase                           |

|               |   |
|---------------|---|
| CARD          | caspase recruitment domain                            |
| Caspase/Casp. | Cysteinylnl aspartate-specific proteases              |
| cDNA          | complementary DNA                                     |
| CDCA          | Chenodeoxycholsäure                                   |
| c-Flip        | Fas associated deathdomain-like ICE-inhibitor protein |
| cl.           | cleaved   |
| Cyto c        | Cytochrom c   |
| D             | Asparaginsäure  |
| dATP          | Desoxy- Adenosin-5`-Triphospat                        |
| DCA           | Deoxycholsäure  |
| DD            | death domain  |
| DED           | death effector domain                                 |
| DIABLO        | direct IAP binding protein with low pI                |
| DISC          | death-inducing signalling complex                     |
| DMSO          | Dimethylsulfoxid                                      |
| DNA           | Desoxyribonukleinsäure                                |
| DR            | death receptor  |
| ds            | doppelsträngig  |
| E             | Glutaminsäure   |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure                          |
| EGFR          | epidermal growth-factor receptor                      |
| EndoG         | Endonuclease G  |
| ER            | Endoplasmatisches Retikulum                           |
| FAAs          | free fatty acids                                      |
| FasL          | Fas Ligand  |
| FADD          | Fas-associated death domain protein                   |
| FCS           | Fetales Kälberserum                                   |
| FLIP          | FLICE (Caspase-8)-inhibitory protein                  |
| FMK           | Fluoromethylketon                                     |
| G             | Guanin  |
| GCDCA         | Glycochenodeoxycholsäure                              |
| GFP           | green fluorescent protein                             |
| h             | Stunde(n)   |
| HCC           | Hepatozelluläres Carcinom                             |

|                      |   |
|----------------------|---|
| H <sub>2</sub> DCFDA | Dichlorodihydrofluoreszin Diacetat          |
| HDL                  | heavy density lipoprotein                   |
| HRP                  | horseradish peroxidase                      |
| I                    | Isoleucin                                   |
| IAP                  | inhibitor of apoptosis                      |
| ICAD                 | inhibitor of CAD                            |
| IR                   | Insulinresistenz                            |
| JNK                  | c-Jun N-terminal kinase                     |
| K                    | Kontrolle                                   |
| Kb                   | Kilobasen                                   |
| kD                   | Kilodalton                                  |
| LCA                  | Lithocholsäure                              |
| Lpr                  | lymphoproliferativ                          |
| M                    | Mol   |
| m                    | Milli-                                      |
| MAPK                 | mitogen activated protein kinase            |
| Mdr                  | multidrug resistance protein                |
| Min                  | Minute(n)                                   |
| ml                   | Milliliter                                  |
| MPT                  | mitochondrial permeability transition       |
| mRNA                 | messenger RNA                               |
| Mrp                  | multidrug resistance-associated protein     |
| MW                   | Mittelwert                                  |
| μ                    | Mikro-                                      |
| n                    | Nano-                                       |
| NADPH                | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| NAFLD                | non-alcoholic fatty liver disease           |
| NASH                 | non-alcoholic steatohepatitis               |
| NF-κB                | nuclear factor kappa B                      |
| Ntcp                 | Na-taurocholate cotransporting polypeptide  |
| Oatp                 | organic anion transporting polypeptide      |
| O.                   | Oleic Acid                                  |
| P                    | Palmitic Acid                               |
| PBC                  | Primär biliäre Zirrhose                     |

|                   |  |
|-------------------|--|
| PBS               | phosphate buffered saline                        |
| PFIC              | primär familiäre intrahepatische Cholestase      |
| PI <sub>3</sub> K | Phosphatidylinositol-Kinase                      |
| PKC               | Protein Kinase C                                 |
| PSC               | Primär sklerosierende Cholangitis                |
| PTP               | permeability transition pore                     |
| PVDF              | Polyvinylidendifluorid                           |
| RIP               | receptor interaction protein                     |
| RISC              | RNA-induced silencing complex                    |
| RNA               | Ribonukleinsäure                                 |
| RNAi              | RNA interference                                 |
| ROS               | reactive oxygen species                          |
| rRNA              | ribosomale RNA                                   |
| RT                | Raumtemperatur                                   |
| S                 | geplittet  |
| SD                | Standardabweichung                               |
| SDS               | sodium-dodecyl-sulfat                            |
| SDS-PAGE          | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese              |
| siRNA             | small interfering RNA                            |
| SLCA              | Sulfolithocholsäure                              |
| SMAC              | second mitochondrial activator of caspases       |
| SR                | Sauerstoffradikale                               |
| ss                | single stranded (einzelsträngig)                 |
| tBid              | truncated Bid                                    |
| T                 | Thymin (Nukleinsäure) oder Threonin (Aminosäure) |
| TBS               | tris buffered saline                             |
| TCA               | Taurocholsäure                                   |
| TCDC              | Taurochenodeoxycholsäure                         |
| TLCA              | Taurolithocholsäure                              |
| TNF               | tumor necrosis factor                            |
| TNF-R             | tumor necrosis factor receptor                   |
| TRADD             | TNF receptor associated death domain protein     |
| TRAF              | TNF-associated factor                            |
| TRAIL             | TNF related apoptosis inducing ligand            |

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

|         |  |
|---------|--|
| TRAIL-R | TNF related apoptosis inducing ligand receptor |
| TUDCA   | Tauroursodeoxycholsäure                        |
| U       | Units/Einheiten oder Uracil-Base               |
| UDCA    | Ursodeoxycholsäure                             |
| UV      | Ultraviolett                                   |
| V       | Valin  |
| XIAP    | X-chromosome linked IAP                        |
| Z       | Benzyloxycarbonyl                              |
| Zn      | Zink   |

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).
2. Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. **54**, 1024-33. (2005).
3. Canbay, A., Friedman, S. & Gores, G. J. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* **39**, 273-8 (2004).
4. Lavrik, I. N., Golks, A. & Krammer, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* **115**, 2665-72 (2005).
5. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**, 239-57 (1972).
6. 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* **356**, 37-41 (1992).
7. Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. **56**, 110-56. (1977).
8. Rust, C. & Gores, G. J. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* **108**, 567-74. (2000).
9. Earnshaw, W. C. Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 337-43 (1995).
10. Schoemaker, M. H. & Moshage, H. Defying death: the hepatocyte's survival kit. *Clin Sci (Lond)*. **107**, 13-25. (2004).
11. Reed, J. C. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. **157**, 1415-30. (2000).
12. Granville, D. J., Carthy, C. M., Hunt, D. W. & McManus, B. M. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest*. **78**, 893-913. (1998).
13. Lemasters, J. J. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*. **276**, G1-6. (1999).



14. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* **107**, 3569-3577 (1994).
15. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801 (2000).
16. Milligan C.E., S. L. Programmed cell death during animal development. *Br Med Bull* **53**, 570-90 (1997).
17. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17**, 3261-3270 (1998).
18. Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochem Biophys Acta* **1551**, F1-F37 (2001).
19. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**, 44-51 (1997).
20. Ogasawara, J. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. **364**, 806-9. (1993).
21. Manning, F. C. & Patierno, S. R. Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer Investigation* **14**, 455-65 (1996).
22. Faubion, W. & Gores, G. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* **29**, 1-4 (1999).
23. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **21**, 8247-8254 (2001).
24. Kroemer, G. & Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. **6**, 513-9. (2000).
25. Martinou JC. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* **399**, 411-412 (1999).
26. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* **264**, 678-701 (1999).
27. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341(Pt2)**, 233-249 (1999).
28. Li, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489 (1997).

29. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufman SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424 (1999).
30. Vanags, D. M., Porn-Ares, M. I., Coppola, S., Burgess, D. H. & Orrenius, S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem.* **271**, 31075-85. (1996).
31. Geng, Y. J. et al. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol.* **77**, 294-302. (1998).
32. Enari, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* **391**, 43-50. (1998).
33. 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* **102**, 33-42 (2000).
34. 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* **102**, 43-53 (2000).
35. 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* **397**, 441-446 (1999).
36. 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* **276**, 16391-16398 (2000).
37. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99 (2001).
38. 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* **25**, 559-564 (1995).
39. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922-2933 (2001).
40. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316 (1998).

41. Cikala M, Wim B, Hobmayer E, Bottger A, David C. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* **9**, 959-962 (1999).
42. Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**, 217-245 (2000).
43. 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* **8**, 1001-1008 (1998).
44. Muzio M, Stickwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**, 2926-2930 (1998).
45. 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* **90**, 405-413 (1997).
46. 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* **274**, 11549-11556 (1999).
47. Kluck, R., Bossy-Wetzel, E., Green, D. & Newmeyer, D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136 (1997).
48. Scaffidi, C. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**, 1675-87. (1998).
49. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490 (1998).
50. Roberts, L. & Gores, G. The role of hepatocyte apoptosis in liver diseases and growth regulation. *Progress in liver diseases* **15**, 57-83 (1997).
51. Shimamatsu, K. & Wanless, I. Role of ischemia in causing apoptosis, atrophy, and nodular hyperplasia in human liver. *Hepatology* **26**, 343-350 (1997).
52. Feldmann, G. Liver apoptosis. *Journal of Hepatology* **26**, 1-11 (1997).
53. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* **85**, 781-784 (1996).
54. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. **407**, 789-95. (2000).
55. Yin, X. M. et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*. **400**, 886-91. (1999).
56. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).

57. Paumgartner, G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol.* **12**, 4445-51. (2006).
58. Pusch, T. & Beuers, U. Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World J Gastroenterol.* **12**, 3487-95. (2006).
59. Sokol, R. J., Devereaux, M., Dahl, R. & Gumprich, E. "Let there be bile"-- understanding hepatic injury in cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **43 Suppl 1**, S4-9. (2006).
60. Poupon, R., Chazouilleres, O. & Poupon, R. E. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol* **32(1)**, 129-40. (2000).
61. Poupon, R. & Poupon, R. E. Treatment of primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **14**, 615-28. (2000).
62. Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* **28**, 1449 - 1453 (1998).
63. Schoemaker, M. H. et al. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* **39**, 1563-73 (2004).
64. Gerok, B. Hepatologie. *Urban & Schwarzenberg 2.Auflage* (1995).
65. Hofmann, A. F. Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* **4**, 4S-14S (1984).
66. Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B. & Meier, P. J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology.* **126**, 322-42. (2004).
67. Trauner M, Boyer JL. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function and Regulation. *Physiol Rev* **83**, 633- 671 (2003).
68. Kullak-Ublick, G. A., Beuers, U. & Paumgartner, G. Hepatobiliary transport. *J Hepatol.* **32(1)**, 3-18. (2000).
69. Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, et al. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **110**, 199-209 (1996).
70. 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* **28**, 544A (1998).

71. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koepfel TA, Schlosser SF, et al. The rat canalicular conjugate export pump (mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* **113**, 255-264 (1997).
72. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localize to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **29**, 1156-1163 (1999).
73. Kobak, G. E. et al. Increased susceptibility of fat-laden Zucker-rat hepatocytes to bile acid-induced oncotic necrosis: an in vitro model of steatocholestasis. *J Lab Clin Med.* **145**, 247-62. (2005).
74. Patel, T. & Gores, G. J. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* **21**, 1725-41 (1995).
75. Koga, H., Sakisaka, S., Ohishi, M., Sata, M. & Tanikawa, K. Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **25**, 1077-84 (1997).
76. Greim, H. et al. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* **63**, 846-50 (1972).
77. Rust, C. et al. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem.* **275**, 20210-6. (2000).
78. Patel, T., Bronk, S. F. & Gores, G. J. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Journal of Clinical Investigation* **94**, 2183-92 (1994).
79. Schmucker, D. L., Ohta, M., Kanai, S., Sato, Y. & Kitani, K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* **12**, 1216-21 (1990).
80. Faubion, W. et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* **103**, 137-145 (1999).
81. Higuchi, H. et al. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 38610-8. (2001).
82. Sodeman, T., Bronk, S. F., Roberts, P. J., Miyoshi, H. & Gores, G. J. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **278**, G992-9. (2000).

83. Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P. J., Burgart, L. J. & Gores, G. J. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* **117**, 669-77. (1999).
84. Higuchi, H. et al. Bid antisense attenuates bile acid-induced apoptosis and cholestatic liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 866-73. (2001).
85. Schoemaker, M. H. 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.* **36**, 742-50. (2002).
86. Bajt, M. L., Lawson, J. A., Vonderfecht, S. L., Gujral, J. S. & Jaeschke, H. Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a caspase-8 inhibitor in vivo: evidence for a postmitochondrial processing of caspase-8. *Toxicol Sci.* **58**, 109-17. (2000).
87. Cowling, V. & Downward, J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ.* **9**, 1046-56. (2002).
88. Serviddio, G. et al. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology.* **39**, 711-20. (2004).
89. Yerushalmi, B., Dahl, R., Devereaux, M. W., Gumprich, E. & Sokol, R. J. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology.* **33**, 616-26. (2001).
90. Sokol, R. J. et al. Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology.* **114**, 164-74. (1998).
91. Sokol, R. J., Devereaux, M. W. & Khandwala, R. Effect of oxypurinol, a xanthine oxidase inhibitor, on hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *Pediatr Res.* **44**, 397-401. (1998).
92. Tsai, L. Y., Lee, K. T. & Liu, T. Z. Evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in experimental obstructive jaundice of rats. *Free Radic Biol Med.* **24**, 732-7. (1998).
93. Krahenbuhl, S., Talos, C., Fischer, S. & Reichen, J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology.* **19**, 471-9. (1994).

94. Sokol, R. et al. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatric Research* **49**, 519-531 (2001).
95. Sokol, R. J., Winklhofer-Roob, B. M., Devereaux, M. W. & McKim, J. M., Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology*. **109**, 1249-56. (1995).
96. Rodrigues, C. M., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T. & Steer, C. J. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*. **101**, 2790-9. (1998).
97. Rodrigues, C. M., Fan, G., Wong, P. Y., Kren, B. T. & Steer, C. J. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* **4**, 165-78. (1998).
98. Reinehr, R., Graf, D. & Haussinger, D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* **125**, 839-53 (2003).
99. Sokol, R. J., Winkelhofer-Roob, B. M., Devereaux, M. W. & McKim, J. M. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* **109**, 1249-1256 (1995).
100. Botla, R., Spivey, J. R., Aguilar, H., Bronk, S. F. & Gores, G. J. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol Exp Ther*. **272**, 930-8. (1995).
101. Rodrigues, C. M., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T. & Steer, C. J. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* **101**, 2790-9 (1998).
102. Higuchi, H., Bronk, S. F., Tanai, M., Canbay, A. & Gores, G. J. Cholestasis increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-R2/DR5 expression and sensitizes the liver to TRAIL-mediated cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 461-7 (2002).
103. Reinehr, R., Becker, S., Wettstein, M. & Haussinger, D. Involvement of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology*. **127**, 1540-57. (2004).

104. Reinehr, R. et al. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* **129**, 2009-31 (2005).
105. Schoemaker MH, G. W., 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* **39**, 1141-1143 (2004).
106. Kurosawa, H., Que, F. G., Roberts, L. R., Fesmier, P. J. & Gores, G. J. Hepatocytes in the bile duct-ligated rat express Bcl-2. *American Journal of Physiology* **272**, G1587-93 (1997).
107. Charlotte, F. et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *American Journal of Pathology* **144**, 460-465 (1994).
108. Gasbarrini, G. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: defining a common problem. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **9**, 253-9. (2005).
109. Bradbury, M. W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **290**, G194-8. (2006).
110. Mulhall, B. P., Ong, J. P. & Younossi, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol.* **17**, 1136-43. (2002).
111. Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. & Oh, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* **55**, 434-8. (1980).
112. Sheth, S. G., Gordon, F. D. & Chopra, S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med.* **126**, 137-45. (1997).
113. Matteoni, C. A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* **116**, 1413-9. (1999).
114. Harrison, S. A., Torgerson, S. & Hayashi, P. H. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol.* **98**, 2042-7. (2003).
115. Bacon, B. R., Farahvash, M. J., Janney, C. G. & Neuschwander-Tetri, B. A. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology.* **107**, 1103-9. (1994).
116. Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. & Bacon, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* **94**, 2467-74. (1999).



117. Powell, E. E. et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. **11**, 74-80. (1990).
118. Day, C. P. & James, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. **114**, 842-5. (1998).
119. Ribeiro, P. S. et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* **99**, 1708-17 (2004).
120. Feldstein, A. E. et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **125**, 437-43 (2003).
121. Younossi, Z. M. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* **28**, 2-12. Epub 2008 Apr 11. (2008).
122. Nehra, V., Angulo, P., Buchman, A. L. & Lindor, K. D. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* **46**, 2347-52. (2001).
123. Rashid, A. et al. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology*. **29**, 1131-8. (1999).
124. Pessayre, D., Mansouri, A. & Fromenty, B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **282**, G193-9. (2002).
125. Yang, S. Q., Lin, H. Z., Mandal, A. K., Huang, J. & Diehl, A. M. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology*. **34**, 694-706. (2001).
126. Xu, A. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest.* **112**, 91-100. (2003).
127. Pelleymounter, M. A. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. **269**, 540-3. (1995).
128. Phillips, M. S. et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet.* **13**, 18-9. (1996).
129. Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance in humans. *Am J Cardiol.* **84**, 3J-10J. (1999).

130. Cortez-Pinto, H. et al. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Jama*. **282**, 1659-64. (1999).
131. Li, Z. et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. **37**, 343-50. (2003).
132. Rust, C. et al. Sulfasalazine reduces bile acid induced apoptosis in human hepatoma cells and perfused rat livers. *Gut* **55**, 719-27 (2006).
133. Meergans, T., Hildebrandt, A. K., Horak, D., Haenisch, C. & Wendel, A. The short prodomain influences caspase-3 activation in HeLa cells. *Biochem J* **349**, 135-140 (2000).
134. Stennicke, H. R. et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* **273**, 27084-90 (1998).
135. Kim, B. J., Ryu, S. W. & Song, B. J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*. **281**, 21256-65. Epub 2006 May 18. (2006).
136. Araya, J. et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. **106**, 635-43. (2004).
137. Patel, T., Roberts, L. R., Jones, B. A. & Gores, G. J. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Seminars in Liver Disease* **18**, 105-14 (1998).
138. Rodrigues, C. M. & Steer, C. J. Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. *Gastroenterology* **117**, 732-6. (1999).
139. Yoon JH, Gores GJ. Death-receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol* **37(3)**, 400-410 (2002).
140. Glasova, H., Berghaus, T. M., Kullak-Ublick, G. A., Paumgartner, G. & Beuers, U. Tauroursodeoxycholic acid mobilizes alpha-PKC after uptake in human HepG2 hepatoma cells. *Eur J Clin Invest*. **32**, 437-42. (2002).
141. Medema, J. P. et al. Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol*. **27**, 3492-8. (1997).
142. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. & Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. **85**, 803-15. (1996).

143. Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L. & Lenardo, M. J. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem.* **273**, 4345-9. (1998).
144. Slee, E. A. et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* **144**, 281-92. (1999).
145. Wachs, F. P. et al. 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* **20**, 103-13 (2005).
146. Sohn, D., Schulze-Osthoff, K. & Janicke, R. U. Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **280**, 5267-73. Epub 2004 Dec 15. (2005).
147. Kuwana, T. et al. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem.* **273**, 16589-94. (1998).
148. Schoemaker, M. H. 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* **39**, 153-61 (2003).
149. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
150. Vrenken, T. E., de la Rosa, L. C., Buist-Homan, M. & Moshage, H. Caspase-6 is involved in bile acid induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology* **40**, 566A (2004).
151. Cohen, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* **326**, 1-16 (1997).
152. Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* **19**, 621-6. (1977).
153. Garcia-Calvo M., P. E. P., Rasper D.M., Vaillancourt J.P., Zamboni R., Nicholson D.W., thornberry N.A., Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death and Differentiation* **6**, 362-369 (1999).
154. Unger, R. H. & Orci, L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta.* **1585**, 202-12. (2002).
155. Powell, E. E., Jonsson, J. R. & Clouston, A. D. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology.* **42**, 5-13. (2005).

156. Wang, D., Wei, Y. & Pagliassotti, M. J. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. **147**, 943-51. Epub 2005 Nov 3. (2006).
157. Chitturi, S. & Farrell, G. C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* **21**, 27-41 (2001).
158. Galle, P. R. & Kramer, P. H. CD95-induced apoptosis in human liver disease. *Semin Liver Dis* **18**, 141-51 (1998).
159. Feldstein, A. E. et al. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol*. **39**, 978-83. (2003).
160. Feldstein, A. E. et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. **125**, 437-43. (2003).
161. Canbay, A. et al. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* **123**, 1323-30 (2002).
162. Canbay, A. et al. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* **83**, 655-63 (2003).
163. Lawson, J. A., Fisher, M. A., Simmons, C. A., Farhood, A. & Jaeschke, H. Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury. *Hepatology*. **28**, 761-7. (1998).
164. Jaeschke, H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology*. **35**, 964-6. (2002).
165. Jaeschke, H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol*. **27**, 23-7. (2002).
166. Maher, J. J., Scott, M. K., Saito, J. M. & Burton, M. C. Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis. *Hepatology*. **25**, 624-30. (1997).
167. Canbay, A. et al. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* **112**, 152-9 (2003).
168. Canbay, A. et al. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest*. **83**, 655-63. (2003).
169. Lauber, K. et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*. **113**, 717-30. (2003).

170. Platt, N., da Silva, R. P. & Gordon, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* **8**, 365-72. (1998).
171. Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* **275**, 2247-50. (2000).
172. Friedman, S. L. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* **19**, 129-40 (1999).
173. Razzaque, M. S., Ahsan, N. & Taguchi, T. Role of apoptosis in fibrogenesis. *Nephron.* **90**, 365-72. (2002).
174. Hagimoto, N. et al. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **17**, 272-8. (1997).
175. Feldstein, A. E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* **40**, 185-94. (2004).
176. Malhi, H., Bronk, S. F., Werneburg, N. W. & Gores, G. J. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem.* **281**, 12093-101. Epub 2006 Feb 27. (2006).
177. Gomez-Lechon, M. J. et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* **165**, 106-16. Epub 2006 Nov 23. (2007).
178. Koteish, A. & Diehl, A. M. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* **21**, 89-104 (2001).
179. Angulo, P. & Lindor, K. D. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* **17 Suppl**, S186-90. (2002).
180. Chitturi, S. et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology.* **35**, 373-9. (2002).
181. Ikejima, K. et al. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology.* **34**, 288-97. (2001).
182. Saxena, N. K., Ikeda, K., Rockey, D. C., Friedman, S. L. & Anania, F. A. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology.* **35**, 762-71. (2002).
183. Malhi, H., Gores, G. J. & Lemasters, J. J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology.* **43**, S31-44. (2006).
184. Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B. S., Bashmakov, Y. & Horton, J. D. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.* **273**, 35299-306. (1998).

185. Sato, H., Mohamed, T., Goto, A., Oikawa, S. & Kurosawa, T. Fatty acid profiles in relation to triglyceride level in the liver of dairy cows. *J Vet Med Sci.* **66**, 85-7. (2004).
186. Hickson-Bick, D. L., Sparagna, G. C., Buja, L. M. & McMillin, J. B. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282**, H656-64. (2002).
187. Yamagishi, S. et al. Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes. *Mol Med.* **8**, 179-84. (2002).
188. Higuchi H., G. G. J. Bile Acid Regulation of Hepatic Physiology IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G734-G738 (2003).

## 8 LEBENS LAUF

|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| Name                | Wild            |
| Vorname             | Nadine Yvonne   |
| Geburtstag          | 9. Oktober 1981 |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch         |

### Schulbildung

|                   |   |
|-------------------|---|
| 09/1988 - 07/1992 | Grundschule an der Kleinfeldstraße, Germering |
| 09/1992 – 05/2001 | Carl-Spitzweg Gymnasium, Germering            |

### Studium

|                |  |
|----------------|--|
| 04/2002 – 2008 | Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 06/2008        | Erteilung der Approbation als Ärztin   |

### Promotion

|             |  |
|-------------|--|
| 2005 – 2007 | Anfertigung der vorliegenden Promotionsschrift im Rahmen eines Promotionsstipendiums der Molekularen und systembiologischen Medizin (Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität): Labor für hepatobiliäre Forschung, Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern (Leitung: Prof. Dr. U. Beuers) |
|-------------|--|

### **Praktisches Jahr**

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Februar-Juni 2007        | Hôpital Cantonal de Fribourg, Université de Lausanne<br>(Chirurgie/Orthopädie/Notfallmedizin)            |
| Juni-Oktober 2007        | Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und<br>Geburtshilfe, Großhadern (Gynäkologie und Geburtshilfe) |
| Oktober 2007-Januar 2008 | Städtisches Klinikum München GmbH, Krankenhaus<br>München – Neuperlach (Innere Medizin)                  |

### **Publikationen**

Pusl T, Wild N, Vennegeerts T, Wimmer R, Göke B, Brand S, Rust C. Free fatty acids sensitize hepatocytes to bile acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 371(3):441-5. (2008)

Rust C, Wild N, Vennegeerts T, Wimmer R, Beuers U. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *J Biol Chem.* 284 (5):2908-16 (2009)

### **Kurzfassungen**

Rust C, Wild N, Vennegeerts T, Beuers U. The role of caspase 6 in bile acid-induced liver cell apoptosis. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the EASL, Barcelona Spain, 11.4.-15.4.2007. *J Hepatol* 2007; 46:S291.

Rust C, Wild N, Vennegeerts T, Beuers U. Die Rolle der Caspase-6 für die Gallensäuren induzierte Apoptose in Hepatozyten. 62. Jahrestagung der DGVS, Bochum, 12.-15.09.2006. *Z Gastroenterol* 2007; 45:848.



## 9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. U. Beuers für die Möglichkeit in der Medizinischen Klinik II des Klinikum Großhaderns der Ludwig-Maximilians-Universität München die Doktorarbeit durchführen zu können und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, sowie für die fantastische Unterstützung während des gesamten Zeitraums. Seine konstruktive Kritik, seine Anregungen und seine Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. C. Rust für die exzellente fachliche Betreuung meiner Arbeit. Sein durchweg positives Denken und seine Hilfe bei allen Problemen, die teilweise über diese Arbeit hinausgingen, halfen mir dabei die Freude an der Forschung und mein Ziel vor Augen nie zu verlieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Timo Vennegeerts bedanken, der mich fantastisch und mit großen Engagement in sämtliche Methoden eingewiesen hat. Besonders bedanken möchte ich mich auch für seine geduldige und humorvolle Art die meine Zeit im Labor unvergesslich macht. Ralf Wimmer möchte ich danken, dass er mir bei den unterschiedlichsten Problemen zu jeder Zeit tatkräftig zur Seite stand. Seine guten Ideen und Anregungen haben oftmals zur Lösung zunächst unlösbarer Probleme beigetragen. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. T. Pusl für die angenehme Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Dem ganzen Laborteam danke ich für die engegebrachte Freundschaft und die engagierte und außergewöhnliche Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Als letztes möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für die moralische Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.