

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern
KLINIKUM DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. MED. B. GÖKE

**Betamuricholsäure schützt vor Gallensäure-induzierter Apoptose
in Hepatozyten von Maus, Ratte und Mensch**

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

vorgelegt von

Carl-Philipp Kleiss
aus
Mannheim

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Rust

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Heinrich Kremer
Priv. Doz. Dr. med. Thomas Pusl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2014

Eidesstattliche Versicherung

Kleiss, Carl-Philipp

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
Betamuricholsäure schützt vor Gallensäure-induzierter Apoptose in Hepatozyten
von Maus, Ratte und Mensch

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel
bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd
übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter
Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher
oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines
akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.3.14

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

1 EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1 CHOLESTATICHE LEBERERKRANKUNGEN	- 1 -
1.1.1 <i>Therapieansätze und Mechanismen</i>	- 4 -
1.1.2 <i>Gallensäuren und hepatobiliäre Transportmechanismen</i>	- 6 -
1.1.3 <i>Formen der Leberzellschädigung bei Cholestase</i>	- 8 -
1.1.4 <i>Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Apoptose in Hepatozyten</i>	- 9 -
1.2 APOPTOTISCHER ZELLTOD.....	- 11 -
1.2.1 <i>Grundlagen</i>	- 11 -
1.2.2 <i>Bedeutung für den Organismus</i>	- 12 -
1.2.3 <i>Molekulare Mechanismen der Apoptose</i>	- 12 -
1.2.4 <i>Apoptose während Cholestase</i>	- 16 -
1.2.5 <i>Mitochondriales Membranpotential</i>	- 17 -
1.3 FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT	- 19 -
2 MATERIAL.....	- 20 -
2.1 PUFFER UND LÖSUNGEN	- 20 -
2.2 KOMPLEXE REAGENZIEN UND REAKTIONS-SETS („KITS“).....	- 21 -
2.3 SONSTIGE MATERIALEN, CHEMIKALIEN UND GERÄTE	- 21 -
2.4 ANTIKÖRPER	- 22 -
3 METHODEN.....	- 23 -
3.1 ISOLATION UND GEWINNUNG PRIMÄRER HEPATOZYTEN	- 23 -
3.1.1 <i>Primäre Rattenhepatozyten</i>	- 23 -
3.1.2 <i>Primäre Maushepatozyten</i>	- 23 -
3.1.3 <i>Primäre Hamsterhepatozyten</i>	- 24 -
3.2 KULTIVIERUNG PRIMÄRER HEPATOZYTEN.....	- 25 -
3.2.1 <i>Primäre Rattenhepatozyten</i>	- 25 -
3.2.2 <i>Primäre Maushepatozyten</i>	- 25 -
3.2.3 <i>Primäre Hamsterhepatozyten</i>	- 26 -
3.3 KULTIVIERUNG VON HEPG2-NTCP ZELLEN	- 26 -
3.4 STABILE TRANSFEKTION DER HEPG2 ZELLEN	- 27 -
3.5 APO-ONE HOMOGENEOUS CASPASE-3/7-AKTIVITÄTSASSAY	- 27 -
3.6 HOECHST 33342-FÄRBUNG.....	- 28 -
3.7 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....	- 29 -
3.8 POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	- 29 -
3.9 WESTERN-BLOT.....	- 30 -
3.10 MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL	- 31 -
3.11 MITOCHONDRIALE TRANSLOKATION VON BAX.....	- 32 -
3.12 STATISTIK.....	- 33 -
4 ERGEBNISSE.....	- 34 -
4.1 B-MURICHOLSÄURE BESITZT ANTI-APOPTOTISCHE EIGENSCHAFTEN	- 34 -

4.1.1	<i>GCDCA-induzierte Apoptose wird durch TβMCA vermindert</i>	- 34 -
4.1.2	<i>β-Muricholsäure schützt in primären Hepatozyten von Nagern vor Apoptose</i>	- 38 -
4.1.3	<i>TβMCA stabilisiert das mitochondriale Membranpotential bei GCDCA-induzierter Apoptose</i>	- 39 -
4.1.4	<i>TβMCA stabilisiert das mitochondriale Membranpotential auch bei palmitat-induzierter Apoptose</i>	- 42 -
4.1.5	<i>TβMCA verhindert die Translokation des proapoptotischen Bax</i>	- 43 -
4.2	REAKTIONEN VERSCHIEDENER SPEZIES AUF HYDROPHILE UND HYDROPHOBE GALLENSÄUREN	- 45 -
4.2.1	<i>Ausmaß der Zellschäden in verschiedenen Spezies bei gallensäuren-induzierter Apoptose</i>	- 45 -
4.2.2	<i>Nekroptose als möglicher Schädigungsmechanismus</i>	- 50 -
5	DISKUSSION	- 53 -
5.1	PROTEKTIVE EIGENSCHAFTEN DER B-MURICHOLSÄURE BEI HEPATOZELLULÄRER APOTOSE	- 53 -
5.1.1	<i>Tauro-β-Muricholsäure verhindert hepatzelluläre Apoptose durch eine Stabilisierung des Mitochondrialen Membranpotentials</i>	- 54 -
5.1.2	<i>TβMCA verhindert Palmitat-induzierte Apoptose</i>	- 56 -
5.1.3	<i>Zusammenfassung</i>	- 57 -
5.2	GALLENSÄUREN-INDUIZIERTE APOTOSE IN VERSCHIEDENEN SPEZIES	- 58 -
5.2.1	<i>Unterschiede bei der Caspase-Aktivität</i>	- 59 -
5.2.2	<i>Die Nekroptose in primären Rattenhepatozyten</i>	- 60 -
5.2.3	<i>Zusammenfassung</i>	- 61 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 63 -
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 65 -
8	LITERATURVERZEICHNIS	- 68 -
9	LEBENSLAUF	- 78 -
10	DANKSAGUNG	- 81 -

1 Einleitung

1.1 Cholestatische Lebererkrankungen

Cholestase führt zu einer Akkumulation gallepflichtiger Substanzen in der Leber und im Blut. Laborchemisch sind bei Cholestase in der Regel die Laborparameter γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) und die alkalische Phosphatase (aP) im Serum erhöht, im späteren Verlauf oft auch das Bilirubin. Klinisch kann es zu Pruritus, Ikterus und Müdigkeit kommen. Im Verlauf entwickeln die Patienten häufig eine biliäre Zirrhose, bei der am Ende die Lebertransplantation als letzte Therapieoption steht. Cholestase kann aufgrund verschiedener Ursachen auftreten. Prinzipiell kann dies durch mechanische Ursachen wie einen Pankreaskopf-Tumor oder die Choledocholithiasis ausgelöst werden, die einen adäquaten Galleabfluss behindern und so zu einer Cholestase führen. Auf der anderen Seite stehen chronische, intrahepatische Erkrankungen. Am häufigsten beim Erwachsenen sind dies die primär biliäre Zirrhose (PBC) und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC).^{1,2} Im Kindesalter hingegen dominieren Krankheiten 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.³ Ebenso können hormonelle, autoimmune oder medikamentöse Ursachen Auslöser einer cholestatischen Erkrankung sein.⁴ Prinzipiell geht man bei der Cholestase davon aus, dass die Akkumulation potentiell toxischer Gallensäuren einen entscheidenden Beitrag zur Leberzellenschädigung liefert. So kommt es bei cholestativen Erkrankungen sowohl bei Cholangiozyten, als auch bei Hepatozyten zu einer Schädigung. In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass vor allem hydrophobe Gallensäuren zu einer Leberzellenschädigung führen.^{5,6}

Die **primäre biliäre Zirrhose (PBC)** ist eine autoimmune, chronisch cholestatische Erkrankung, die hauptsächlich die Cholangiozyten der intralobulären Gallengänge in der Leber betrifft. Die PBC führt unbehandelt immer zu einer Fibrose und im späteren Verlauf meist zur Zirrhose, wobei der natürliche Verlauf ca. 10-20 Jahren beträgt. Die Erkrankung betrifft hauptsächlich Frauen (9-10:1 w > m) in einem Alter über 40 Jahren mit einer Prävalenz von 1: 2000.⁷ Das folgende Diagramm, aus

Poupon et al. J Hep 2010, zeigt den Verlauf der PBC vom Auslöser bis zum finalen Leberversagen.¹⁷



Abbildung 1 Verlauf und die Einflüsse der PBC

Die Ursachen der Erkrankung sind aktuell Gegenstand intensiver Forschungen. Spekuliert werden multifaktorielle genetische Faktoren, Infektionen, Umwelteinflüsse oder medikamentös-toxische Ursachen.⁸ Als Beispiel für eine immunvermittelte Induktion der PBC sei das gramnegative Bakterium *Novosphingobium aromaticivorans* genannt, das Proteine mit Homologie zu PDC-E2 exprimiert.⁹ In einer aktuellen Studie werden eine positive Familien- und Raucheranamnese, vorangegangene Infektionen des Urogenitaltrakts und autoimmune Vorerkrankungen als Risikofaktoren angesehen. Des Weiteren wird der Einnahme oraler Kontrazeptiva eine protektive Wirkung zugesprochen.¹⁰ Typische Symptome sind Müdigkeit und Juckreiz, allerdings sind die Patienten zu Beginn häufig asymptomatisch. Die Diagnose wird anhand typischer cholestatischer Serummarker, wie die γ-Glutamyltranspeptidase und die alkalische Phosphatase, gestellt. Bei über 90 % der Patienten ist es möglich, anti-mitochondriale Antikörper (AMA)¹¹, die gegen die E2 Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDC-E2) und verwandter Dehydrogenasen (AMA-M2) gerichtet sind, nachzuweisen.¹²⁻¹⁴ Diese AMA gelten als wesentliches diagnostisches Kriterium. Histologisch ist die PBC durch eine

chronische Inflammation und Fibrose der kleinen septalen und intralobulären Gallengänge charakterisiert.¹⁵⁻¹⁷

Die **primär sklerosierende Cholangitis** ist eine seltene, fibrosierend inflammatorisch verlaufende Erkrankung der intra- und/oder extrahepatischen Gallengänge, bei der es im Verlauf zu fibrotischen und zirrhotischen Umbauten der Leber kommt und am Ende das Leberversagen steht.^{18,19} In 70-90 % der Fälle ist die Erkrankung mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) assoziiert.²⁰ Meistens ist dies die Colitis ulcerosa und nur in wenigen Ausnahmen der Morbus Crohn. Die Prävalenz liegt in Nordeuropa und in den USA bei 1 : 10 000, in etwa 2/3 der Fälle sind Männer betroffen. Das Manifestationsalter der Erkrankung liegt bei 30 – 40 Jahren.²¹⁻²³ Die Pathogenese und Ätiologie sind weitestgehend unbekannt, was eine gezielte und erfolgreiche Therapie derzeit nahezu unmöglich macht. Nach einem Krankheitsverlauf von 12 – 17 Jahren führt dies daher entweder zu einer Lebertransplantation oder zum Tod.^{22,24,25} Eine autoimmune Komponente gilt derzeit als sicher, da andere autoimmune Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ 1, Psoriasis, Zöliakie und Thyreopathien in gehäufter Weise bei PSC Patienten auftreten.²⁶ Zudem besteht eine Assoziation mit den HLA-Haplotypen HLA-D3 und HLA-B8.²⁷⁻²⁹ In jüngster Zeit wird zunehmend spekuliert, dass genetische Variationen und Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung der PSC spielen, wie beispielsweise ein Mangel an Selen und Vitamin D.²⁹ Antinukleäre Antikörper (ANA) sind in bis zu 50 % der Fälle nachweisbar, atypische perinukleäre Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Autoantikörper (atypische pANCA) sogar in 80 % der Fälle.^{30,31} Die Diagnose PSC wird gesichert durch cholangiographisch nachweisbare multifokale Strikturen und Dilatationen der Gallengänge. Als Goldstandard zählen hier die MRCP bzw. ERCP.³² Zur Diagnose gehören außerdem die typische Konstellation von cholestaticischen Serummarkern und dem Ausschluss sekundärer Ursachen, wie Operationen, Trauma, Infektionen oder Tumoren.³¹ Eine der Hauptkomplikationen der PSC ist neben der Zirrhose die Entstehung von cholangiozellulären Karzinomen.^{20,22,31} Ebenso ist bei Patienten, die sowohl an einer PSC als auch an einer CED leiden, das Risiko für kolorektale Tumoren erhöht.

1.1.1 Therapieansätze und Mechanismen

Die für die PBC zurzeit zugelassene Standardtherapie besteht in der Gabe von Ursodeoxycholsäure (UDCA) in einer Dosis von 13-15 mg/kg/d.^{1,17,33} Der Anteil der hydrophilen und nicht-toxischen Gallensäure UDCA im menschlichen Gallepool beträgt ohne Therapie 1-3 %.^{34,35} Schon in den 80er Jahren gaben Studien Hinweise, dass die cholestatischen Serummarker bei Patienten mit hepatischen Erkrankungen durch eine Therapie mit UDCA gesenkt werden können.^{15,36,37} Der genaue Wirkmechanismus der hydrophilen Gallensäure UDCA ist immer noch nicht ganz aufgeklärt.³⁵ Die protektive Wirkung beruht zum einen auf der Verbesserung des Gallensäuretransports aus der Zelle und einer damit verbundenen Entgiftung von hydrophober und toxischer Gallensäuren wie GCDCA und TCDCA, die als vorherrschend bei cholestatischen Erkrankungen gelten.³⁸ Des Weiteren wird eine Gallensäure-induzierte Apoptose in Cholangiozyten und Hepatozyten verhindert.^{15,33,35}

UDCA führt zu einem signifikanten Rückgang der Serummarker wie γ-Glutamyltranspeptidase, alkalische Phosphatase und Bilirubin, sowie des IgM und des Cholesterols.^{15,39} Zudem kommt es zu einer Verzögerung der Fibrose und das histologische Stadium wird verbessert. Das transplantatfreie Überleben ebenso wie das Überleben per se werden verlängert und es kommt zu einer Verbesserung der Lebensqualität. Die Nebenwirkungen von UDCA sind zu vernachlässigen.⁴⁰⁻⁴⁴ Allerdings sprechen in einem frühen Stadium der PBC nur etwa 50 % der Patienten adäquat auf eine Monotherapie mit UDCA an.⁴⁵ Kombinationstherapien mit Prednisolon (10 mg/kg/d) führen zwar zu einer Verbesserung der histologischen Merkmale der PBC, im Gegenzug kommt es allerdings auch zu signifikanten Nebenwirkungen wie der Osteoporose, weshalb eine Langzeittherapie mit Steroiden möglichst vermieden werden sollte.^{46,47} Die Kombination mit Budesonid kann bei Patienten in einem frühen Erkrankungsstadium zu einer Verbesserung biochemischer und histologischer Merkmale führen. Um die Sicherheit dieser Kombination zu beweisen, fehlen derzeit noch Studien mit einem langen follow-up, zudem kann es bei Patienten in einem späten Stadium und schon aufgetretener Zirrhose unter Therapie mit Budesonid zu einer Pfortaderthrombose kommen.⁴⁸⁻⁵¹ Andere Immunsuppressiva wie Azathioprin⁵², Cyclosporin A⁵³ oder Methotrexat⁵⁴ zeigten keine signifikante Besserung oder führten gar zu einer Verschlechterung.³³

Für die PSC existiert derzeit keine erfolgversprechende Therapie.²⁰ Derzeit findet ebenfalls die UDCA (15-20 mg/KG/d) Anwendung in der Therapie, da in Studien mit kleinen Kohorten gezeigt werden konnte, dass es zu einer Verbesserung der Serummarker kommt.^{32,33,55} Allerdings werden die Symptome und noch wichtiger der Progress bis hin zur Lebertransplantation nicht entscheidend verbessert.^{33,56}

Eine Studie aus Skandinavien erreichte trotz der bis dahin größten Studienpopulation nicht die nötige statistische Signifikanz, um eine adäquate Therapieempfehlung auszusprechen.⁵⁷ Von daher sind neue, mit großen Kohorten angelegte Studien dringend erforderlich. Auch der Nutzen von Kortikosteroiden ist fraglich, so dass lediglich eine symptomorientierte Therapie, z.B. mittels ERCP, erfolgen kann und am Ende immer die Lebertransplantation als ultima ratio zur Verfügung steht.^{22,31-33}

Daher wird neuen Therapieansätzen, wie der 24-norUrsodeoxycholsäure große Beachtung geschenkt. Es handelt sich hierbei um das C 23 Homolog der UDCA. Die Mdr2 -/-Maus bietet ein Modell, das Cholangitis-ähnliche Gallengangsentzündungen zeigt. In diesem Modell war die norUDCA der UDCA bezüglich der Verbesserung der leberspezifischen Serummarker, sowie der Entzündungszeichen und des Fibrosegrades überlegen.⁵⁸ Zudem wurden Enzyme und Transporter induziert, die die Schädigung in der Leber verringern. NorUDCA wird vom Menschen wohl gut toleriert und bietet damit eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Studien.^{20,59} Weitere potentielle neue Ansätze in der Therapie stehen mit Agonisten nukleärer Rezeptoren, wie z.B. dem Pregnane X receptor (PXR) oder dem Farnesoid X receptor (FXR) zur Verfügung. Diese nukleären Rezeptoren kontrollieren die Expression einer Vielzahl von Genen in der Leber und im Intestinum und sind außerdem in Prozesse der Biotransformation in der Leber involviert. Aktiviert werden diese Rezeptoren u.a. durch hydrophobe Gallensäuren.²⁰

Eine weitere mögliche Therapieoption, der immer wieder Beachtung geschenkt wurde, ist die β-Muricholsäure (βMCA). Es handelt sich hierbei um eine mehrfach-hydroxylierte Gallensäure, die vornehmlich von Nagern synthetisiert wird.⁶⁰ Interessanterweise kann die βMCA vom Menschen nicht verstoffwechselt werden und spielt somit im physiologischen Gallepool keine entscheidende Rolle.⁶¹ Im Gegensatz zur UDCA besitzt die βMCA an der 6β-Position eine zusätzliche Hydroxylgruppe, was sie noch hydrophiler macht. In der Vergangenheit gab es erste Hinweise für den Nutzen von βMCA bei der Behandlung von cholesterinbedingten Gallensteinen *in vitro*.⁶² In einer aktuelleren Studie konnte sogar gezeigt werden,

dass β MCA wirksamer als UDCA bei der Gallensteinbehandlung an Mäusen ist.⁶³ In weiteren Studien zeigten sich positive Effekte der taurin-konjugierten β -Muricholsäure ($T\beta$ MCA) bei Taurolithocholsäure-induzierter Cholestase in primären Rattenhepatozyten.⁶⁴ Auch in einem Rattenperfusionsmodell, bei dem die Cholestase durch Taurocholsäure hervorgerufen wurde, konnten die protektiven Eigenschaften belegt werden.⁶⁵

Die hydrophobe und toxische Chenodeoxycholsäure (CDCA) kann von der Ratte zu β -MCA umgewandelt werden, dieser Vorgang findet sich in der menschlichen Leber jedoch nicht.⁶⁶ Auch entstehen keine weiteren schädigenden Gallensäuren, da wie weiter oben bereits erwähnt, der Mensch die β MCA nicht verstoffwechseln kann.

1.1.2 Gallensäuren und hepatobiliäre Transportmechanismen

Den Hepatozyten fällt neben ihrer Funktionen für den Stoffwechsel noch die Aufgabe zu, diverse Substanzen aus dem Blut in die Galle zu sezernieren. Durch Transportsysteme an der basolateralen und apikalen Basalmembran werden dort gallepflichtige Stoffwechselprodukte aufgenommen und dann der Galle zugeführt.

Einer der wichtigsten Transporter für Gallensäuren stellt der sodium-taurocholat-cotransporter (Ntcp) dar.⁶⁷ Dieser transportiert vornehmlich konjugierte Gallensäuren, wohingegen unkonjugierte Gallensäure und andere lipophile Substanzen durch natrium-unabhängige Transporter, wie z.B. der organic-anion polypeptide Transporter (OATP) transportiert werden. Über eine Na/K-ATPase wird ein Transportgradient aufrechterhalten. An der kanalikulären Membran existieren mehrere ATP-abhängige Exportpumpen. Zum einen sind dies das „multidrug-resistance-1 P-glycoprotein“ (MDR1), das „phospholipid transporter multidrug-resistance-3 P-glycoprotein“ (MDR3), der kanalikuläre „multispecific organic-anion transporter“ (MRP 2 oder cMOAT), des Weiteren der für die Gallensäure wichtige Transporter „bile-salt-export pump“ (BSEP oder SPGP).⁶⁸

Die Abbildung 2 nach⁶⁹ gibt einen Überblick über die wichtigsten Transportsysteme in den Hepatozyten.



Abbildung 2

Unter physiologischen Bedingungen wird dabei die Sekretionskapazität durch verschiedene Transportproteine an der kanalikulären Membran der Hepatozyten bestimmt. Durch ein Ungleichgewicht zwischen der Ausscheidung in die Galle und der Aufnahme, sowie einem verminderten Fluss kommt es zur Akkumulation potentiell toxischer Metaboliten in den Hepatozyten und dadurch zur Cholestase mit der Gefahr von Apoptose und Gewebeuntergang.⁷⁰

Pathophysiologisch kommt es zu einer transkriptionellen Herunterregulierung von Ntcp und OATP, um eine weitere Aufnahme von Gallensäuren und organischen

Anionen zu verhindern und so die Hepatozyten zu schützen. Andererseits wird das Effluxsystem an der basolateralen Membran hochreguliert. Dazu gehören MRP 3 und MRP 4. Ersteres transportiert konjugiertes Bilirubin und andere organische Anionen aus der Leberzelle, während MRP 4 Gallensäuren zusammen mit Glutathion transportiert. Zudem wird die Gallensalz-Exportpumpe (BSEP) verstärkt eingebaut, so dass die Gallensäuren vermehrt in die Galle sezerniert und die Hepatozyten zusätzlich vor weiterer Schädigung geschützt werden.^{68,71,72}

1.1.3 Formen der Leberzellenschädigung bei Cholestase

Prinzipiell führt der Anstieg von Gallensäuren oder anderen toxischen Substanzen bei Cholestase, wie es z.B. bei der PBC und PSC vorkommt, zum Untergang der Hepatozyten.⁷³ *In vitro* geschieht dies dosisabhängig, wobei hydrophobe Gallensäuren in niedrigen mikromolaren Konzentrationen zu einem apoptotischen Zellschaden führen, in höheren auch zu einer Nekrose.⁷⁴ Besonders die glycin-konjugierte Chenodeoxycholsäure (GCDCA) hat einen starken apoptotischen Effekt.^{75,76} In neuerer Zeit wird ein zusätzlicher dritter Mechanismus der Nekroptose diskutiert, bei der Zellen einerseits Todesrezeptor-gesteuert, aber Caspase-unabhängig geschädigt werden.⁷⁷ Zur Illustration der verschiedenen Wege dient die nachfolgende Abbildung⁷⁸

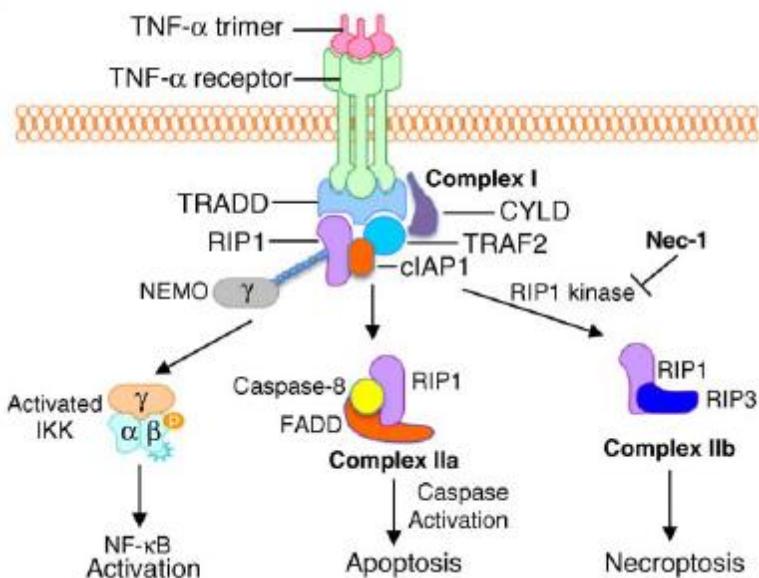


Abbildung 3

Bislang unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die Nekroptose eine bedeutende Rolle bei der Zellschädigung von Rattenhepatozyten spielt, die mit GCDCA inkubiert wurden. Da humane Hepatozyten selbst in hohen Konzentrationen kaum Apoptose zeigen, könnte die Nekroptose auch beim Menschen von Bedeutung sein.

Die Nekrose führt zu einer irreversiblen Zellschädigung, ausgelöst z.B. durch physikalische Verletzung. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es zu einem Anschwellen der Zelle, die Plasmamembran wird zerstört und die Lyse der Zelle eingeleitet. Dadurch werden Bestandteile des Zytosplasmas freigesetzt, die dann wiederum zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe führen.⁷⁹

1.1.4 Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Apoptose in Hepatozyten

Hydrophobe Gallensäuren können potentiell toxische Substanzen darstellen und führen bei einer Cholestase zu einer Gewebeschädigung. Die am besten untersuchte Gallensäure ist die Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA), die quantitativ bedeutendste Gallensäure im menschlichen Serum bei Cholestase mit einer relativ hohen Toxizität.^{80,81} Die Schädigungen konnten *in vivo* und *in vitro* demonstriert werden.^{82,83} Aufgrund der erschwerten Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten wurde die Ratte häufig als Studienmodell verwendet.

GCDCA-induzierte Zellschädigung zeigte alle klassischen Merkmale der Apoptose.⁷⁵ Dies ist beispielsweise eine Aktivierung der Caspase, daher wirken Caspase-Inhibitoren bei der GCDCA-induzierten Apoptose protektiv.^{84,85} Weitere Untersuchungen beschrieben einen Zusammenhang mit der mitochondrialen Stabilität bzw. dem Mitochondrialen Membranpotential (MMP). Zudem kam es zu einem Abbau des ATP Gehalts in der Zelle. Interessanterweise konnte die Stabilität des MMP über eine Hemmung der „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) durch die hydrophile Gallensäure UDCA erreicht werden.⁸⁶⁻⁸⁸

GCDCA kann Apoptose unabhängig von Liganden über den Todesrezeptoren-vermittelten Signalweg durch eine Oligomerisierung von Fas induzieren.⁸⁹ Auch ist die Produktion von ROS (reactive oxygen species), gefolgt von einer „epidermal growth factor receptor“ (EGFR)-vermittelten Tyrosin-Phosphorylierung von Fas, ein wichtiger Schritt bei der Einleitung der Apoptose durch Gallensäuren.⁹⁰ Einen weiteren Mechanismus stellt die Fas-unabhängige Aktivierung der Apoptose dar, wobei GCDCA direkt über einen intrinsischen Mechanismus an den Mitochondrien ansetzt, wenn der schnellere extrinsische Weg nicht zur Verfügung steht.⁸⁵ Eingeleitet durch die liganden-unabhängige Aktivierung von Fas, wird Caspase-8 aktiviert, was weitere Kaskaden des Caspase-Weges auslöst und letztlich in der Apoptose endet.⁹¹ Eine Übersicht über die wichtigsten Schritte bei der Gallensäure-induzierten Apoptose gibt die folgende Abbildung.⁹¹

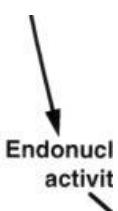


Abbildung 4

1.2 Apoptotischer Zelltod

1.2.1 Grundlagen

Kerr et al. prägten 1972⁹² den Begriff der Apoptose, welcher sinngemäß das Abfallen welker Blätter im Herbst bedeutet und sich aus dem Griechischen ableitet („apo“ = ab, los; „ptosis = das Fallen“). Die Apoptose ist ein energetischer Prozess, der durch einen bestimmten Stimulus, entweder intrinsisch oder extrinsisch ausgelöst wird und kontrolliert ohne Zeichen von Zellruptur oder eines inflammatorischen Geschehens abläuft.⁹³ Morphologisch zeichnet sie sich durch einen Verlust der Adhäsion im Zellverband, eine nukleäre Fragmentierung, die Kondensation von Chromatin und durch ein sogenanntes „membrane blebbing“ aus.⁹⁴ Schließlich schrumpft die Zelle und es bilden sich apoptotische Zellkörperchen („apoptotic bodies“), die durch Makrophagen und benachbarte Zellen, stimuliert durch das auf die Außenseite translozierte Phosphatidylserine, phagozytiert werden.⁹³

Ein weiteres begleitendes biochemisches Kennzeichen stellt die geordnete DNA-Fragmentation dar. Dabei zerschneiden Endonukleasen die DNA in große 50-300-Kb Stücke und dann weiter in kleine 180 bis 200 Basenpaarfragmente, die typisch sind für das klassische Sprossenleitermuster, welches in den meisten apoptotischen Zellen vorgefunden wird.⁹⁵

Letztlich zerfallen die Zellfragmente in apoptotische Körperchen, die dann durch spezialisierte Phagozyten erkannt und phagozytiert werden. Dieser Prozess verläuft insgesamt schnell und kann ein paar Minuten bis hin zu wenigen Stunden andauern.^{91,96,97}

Nichtsdestotrotz gibt es Hinweise, dass der Übergang von Apoptose zur Nekrose fließend ist und es sogar gemeinsame Signaltransduktionswege gibt, so dass die Apoptose nicht immer ohne Inflammation abläuft. In letzter Zeit wurde der Begriff der „Nekroptose“ geprägt.⁹⁸ Allein das Wort impliziert die enge Verknüpfung beider Prozesse. Ganz ähnlich der Apoptose finden sich auch hier kontrollierte und programmierte Abläufe.

1.2.2 Bedeutung für den Organismus

Apoptose spielt für den Organismus eine wichtige Rolle, um defekte oder fehlgebildete Zellen zu eliminieren. In der Embryonalentwicklung wird die Apoptose eingesetzt, um den Körper und einzelne Organe zu formen.^{99,100} Im Einzelnen werden beispielsweise während der Embryonalentwicklung die Hämme zwischen den Fingern apoptotisch entfernt. Auch bei Keimzellen spielt die Apoptose eine gewichtige Rolle, da ein Ausbleiben zu Fehlbildungen führen kann.

Des Weiteren kommt der Apoptose bei diversen Erkrankungen eine wichtige Rolle zu, da es beispielweise beim Ausbleiben zu tumorösen Entartungen kommen kann.¹⁰¹

Bei neurodegenerativen Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson führt eine Überaktivierung der Apoptose zu den jeweils typischen Krankheitsbildern.¹⁰² Daher wird der Apoptose in der Grundlagenforschung großes Interesse entgegengebracht, da man sich neue Therapiekonzepte bei den oben genannten Krankheitsprozessen erhofft.

Weiterhin wird der Apoptose bei der Entstehung verschiedener hepatologischer Krankheitsbilder eine wesentliche Rolle beigemessen. Beispielhaft sei eine Studie genannt, die Apoptose in einem Mausmodell induzierte, was zu einem fulminanten Leberversagen bei den betroffenen Tieren führte.¹⁰³

Zudem führen Fehlregulierungen der Apoptose zur Entstehung von hepatzellulären Karzinomen (HCC), was durch eine Mutation des p53 Onkogens begründet ist.¹⁰⁴

Therapieziele sind daher die Apoptose bei diversen Leberschäden zu minimieren oder auch bei Tumorerkrankungen zu modifizieren und gezielt einzusetzen.⁹¹

1.2.3 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Es existieren derzeit zwei verschiedene Signalwege, über die die Apoptose ausgelöst werden kann und es so zu einer Aktivierung intrazellulärer Proteasen und Endonukleasen kommt.¹⁰⁵

Der erste ist ein **rezeptorvermittelter (extrinsischer) Signalweg**, der über sogenannte Todesrezeptoren an der Plasmamembran der Zelle seinen Ausgang nimmt. Aktuell sind acht verschiedene Todesrezeptoren bekannt, die alle zur „tumor necrosis factor“ (TNF) Superfamilie gehören. Am besten untersucht sind der TNF

receptor 1 (TNF-R1) und Fas (CD95/Apo-1), weitere sind TRAIL-R1 und TRAIL-R2 („tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor“ 1 and 2).¹⁰⁶ Über die jeweiligen Liganden/Rezeptor-Komplexe kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Adapterproteine (z.B. „Fas-associated death domain“, FADD) und Proenzyme (Pro-Caspase-8 und-10), die in ihrer Gesamtheit als sogenannter DISC („death inducing signaling complex“) bezeichnet werden.¹⁰⁷ Über autoproteolytische Prozesse werden nun die Caspase, insbesondere Caspase-8, in ihre aktive Form versetzt und weitere nachgeordnete Caspase führen zur Apoptose.¹⁰⁸

Nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick zum extrinsischen Weg¹⁰⁷ :



Abbildung 5

Der zweite **mitochondriale (intrinsische) Signalweg** wird durch mitochondriale Funktionsstörungen ausgelöst. Als Trigger kommen u.a. UV-Strahlung, Toxine, oxidativer Stress oder auch einige Chemotherapeutika in Frage.¹⁰⁹ Als Folge kommt es zu einer Veränderung der mitochondrialen Membranstabilität, wobei durch den Einbau eines „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) das mitochondriale

Membranpotential (MMP) so verändert wird, dass es zu einer Abgabe mitochondrialer Proteine in das Zytosol kommt. Zu diesen zählen pro-apoptotische 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“), Bid und die Endonuklease G. Diese wiederum fördern die Aktivierung bestimmter Proteasen und den Abbau von Chromatin.^{107,110}

Cytochrom c bindet anschließend an Apaf-1 („apoptosis associated factor“ 1) und aktiviert die wichtige Caspase-9. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet, wodurch weitere Caspase, die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktiviert werden und zum Zelluntergang führen.^{91,111}

Der Rezeptor-vermittelte und der mitochondriale Signalweg sind nicht als strikt voneinander getrennt zu betrachten, sondern stehen vielmehr über das Bid Protein in Verbindung. Dieses Protein ist in der Lage Cytochrom c aus den Mitochondrien freizusetzen, nachdem es durch die Caspase-8 aktiviert wurde.^{91,112}

Die Graphik aus⁹¹ veranschaulicht diese Beziehung:



Abbildung 6

Caspasen, die prinzipiell zu der Familie der Proteasen gezählt werden, spielen eine zentrale Rolle während des Zelluntergangs.¹¹³ Caspasen liegen im Zytosol der Zellen als inaktive Proenzyme vor und müssen durch Proteolysen in ihre aktive Form versetzt werden. Caspasen spalten ihre Substrate an deren Karboxylgruppe an einem Aspartatrest. Sie selbst wiederum benötigen eine Aktivierung ihres Aspartatrestes, um ihre katalytische Aktivität zu erreichen und können so kaskadenartig weitere Caspasen aktivieren.¹⁰⁷ Derzeit sind 14 Caspasen bei Säugetieren bekannt, von denen 12 auch beim Menschen sicher identifiziert wurden (Caspase -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10 und -12). Caspasen können in Initiatorcaspasen (-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (-3, -6, -7) unterteilt werden. Erstere werden durch ihre Bindung an Adaptern (z.B. FADD oder Apaf-1) in einem autokatalytischen Prozess aktiviert und freigesetzt. Die Effektorcaspasen sind nicht fähig, sich selbst zu aktivieren und benötigen daher immer die Proteolyse, ausgelöst durch die Initiatorcaspasen, um nun die typischen, morphologischen Veränderungen der Apoptose in der Zelle, wie Zytoskelettwandlung und „membrane blebbing“ auszulösen.^{105,107}

Nur die oben genannten Caspasen spielen für die Apoptose eine Rolle. Andere wie Caspase-1, -4, -5 und -11 sind bei der Inflammation beteiligt.¹¹⁴

Viele zytoplasmatische Proteine werden für einen geordneten Ablauf der Apoptose benötigt. Darunter besonders hervorzuheben ist die **Bcl-2 Familie**, die zum einen aus pro- aber auch anti-apoptotischen Mitgliedern besteht. Diese Proteine setzen an Mitochondrien an, je nach Überwiegen der pro- oder anti-apoptotischen Signale entscheidet sich, ob der intrinsische Signalweg initiiert wird oder nicht.¹⁰⁷

Bis zu 20 verschiedene Proteine aus der Bcl-2 Familie sind derzeit bekannt, die eine Sequenzhomologie in einer der vier Domänen besitzen, die „Bcl-2 homology“ (BH)-Domänen 1 bis 4.^{115,116} Weiter kann in 3 Subklassen unterschieden werden, wobei die erste die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 enthält. Diese sind vornehmlich in den Mitochondrien lokalisiert, können aber auch im endoplasmatischen Retikulum und der Kernmembran vorkommen. Die anderen beiden Subklassen zeichnen sich durch pro-apoptotische Eigenschaften aus und werden zum einen bezeichnet als „multi-domain Bax-like proteins“, wie Bax und Bak und die „BH3 only“ Gruppe wie z.B. Bid, Bad, Noxa und Puma.¹⁰⁷

In gesunden Zellen liegt Bax im Zytosol als Monomer vor, unterzieht sich, ausgelöst durch einen apoptotischen Stimulus, einer Strukturänderung und lagert sich an der Mitochondrienmembran an. Dies führt zu einer Permeabilitätssteigerung und konsequenterweise zu einer Veränderung des MMP.¹¹⁷⁻¹¹⁹

Durch bestimmte Todessignale werden die „BH3 only“ Proteine aktiviert und aktivieren ihrerseits Bax und Bak durch entweder eine direkte Wechselwirkung oder dadurch, dass bestimmte anti-apoptotische Stimuli geblockt werden.^{120,121}

Dieser Prozess ist für das Zustandekommen einer mitochondrialen Funktionsstörung notwendig und damit auch ein wichtiger Prozess bei der Apoptose.

Wie bereits weiter oben erwähnt, stellt das „BH3-only“-Protein Bid eine wichtige Verbindungstelle zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg dar. Über Caspase-8, die ihrerseits durch Todesrezeptoren eingeschaltet wurde, transloziert Bid zu den Mitochondrien, um dort die Aktivierung von Bax und Bak zu vermitteln. Dies ist entscheidend für die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran.^{107,112}

1.2.4 Apoptose während Cholestase

Schon im ersten Kapitel wurde die Cholestase und ihre Ursachen näher beleuchtet. Akkumulation hydrophober Gallensäuren spielt dabei eine entscheidende Rolle.^{5,38} Zum einen führt dies zum Anschwellen des Hepatozyten, Ruptur der Plasmamembran und als Folge zum Austritt intrazellulärer Bestandteile, was Charakteristika der Nekrose entspricht. Daneben ist aber auch die Apoptose ein entscheidender Schädigungsmechanismus während der Cholestase.^{122,123} Obwohl die intrazellulären Bestandteile in membrumschlossenen Körpern bleiben, kann es bei einer Überschreitung der Phagozytoseaktivität zu einer inflammatorischen Antwort kommen. Dies wurde beispielhaft nachgewiesen, als man intrazelluläre Enzyme im apoptotischen Lebergewebe nachweisen konnte.^{97,124}

Es herrscht zudem Konsens darüber, dass die Apoptose konzentrations- und zeitabhängig auftritt, wobei niedrige Dosen apoptotisch wirken und es in höheren zu nekrotischen Prozessen kommt.^{75,125}

Histologisch zeigen sich typische Merkmale der Apoptose wie die DNA-Fragmentation, die sich z.B. lichtmikroskopisch nachweisen lässt. Eine weitere Möglichkeit der Darstellung bietet die TUNEL-Technik („terminal deoxynucleotid

transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling“), welche das 3'-OH-Ende des DNA-Fragments darstellt. Die apoptotischen Leberzellen erscheinen wie runde, azidophile Körper, die aus dem Zellverband herausgelöst sind. Diese sogenannten „apoptotic bodies“ werden bei einer ganzen Reihe von Lebererkrankungen als „Councilman bodies“ beschrieben.^{91,126,127}

Aufgrund dessen erscheint es sinnvoll, nach Therapieoptionen zu suchen, die bei der Apoptose ansetzen, um hepatzelluläre Erkrankungen behandeln zu können.

1.2.5 Mitochondriales Membranpotential

Es herrscht ein allgemeiner Konsens darüber, dass die mitochondrialen Funktionen bzw. Veränderungen in deren Abläufen eine wichtige Rolle bei apoptotischen Prozessen spielt.^{109,128} Wie schon in einem früheren Abschnitt erwähnt, ist hierbei die „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) oder auch „mitochondrial permeability transition“ (MPT) von entscheidender Bedeutung. Dadurch kommt es zu einer Permeabilitätsveränderung an der Mitochondrienmembran, was zum Anschwellen der Mitochondrien und letztlich zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Diese Membranveränderungen sind das Ergebnis einer Fehlregulation des „adenine nucleotid translocator“ (ANT) der für den geregelten Austausch von ATP/ADP verantwortlich ist.^{125,129} Ein Beweis für die zentrale Rolle des MPT im Prozess der Apoptose konnte durch Studien belegt werden in denen es gelang, durch die Blockade des MPT mit Ciclosporin A einen Zelluntergang zu verhindern.¹³⁰ In isolierten Mitochondrien konnte zudem gezeigt werden, dass Bax über einen direkten Weg das MPT beeinflusst und die Freisetzung von Cytochrom c stimuliert.¹³¹ Diverse Studien legen einen Zusammenhang mit Gallensäuren-induziertem Zelluntergang und mitochondrialer Schädigung, wie z.B. ein Anschwellen der Mitochondrien in gallengangsligierten Ratten oder auch das Auftreten morphologischer Veränderungen in isolierten Mitochondrien aus einer Rattenleber nach Inkubation mit hydrophoben Gallensäuren nahe.¹³²⁻¹³⁵

Wie eingangs erwähnt, kommt es als Konsequenz des MPT zu einem Zusammenbruch des MMP ($\Delta\Psi_m$), was die Atmungskette in ihrer Funktion beeinträchtigt und die lebensnotwendige ATP-Produktion wird gestört.¹²⁵ Weiterhin werden „reactive oxygen species“ (ROS) gebildet und diverse mitochondriale

Proteine werden freigesetzt. Die initiale Öffnung der MPT und die darauffolgende Störung des MMP kann durch verschiedene Faktoren der Apoptose, wie Caspasen oder pro- und anti-apoptotische Bcl-2 Proteine, getriggert werden.^{125,136}

Die hydrophile Ursodeoxycholsäure (UDCA) hat bekanntermaßen einen positiven Einfluss bei cholestatischen Erkrankungen. Auch gibt es Studien, die einen stabilisierenden Effekt der UDCA auf das MMP aufweisen und zusätzlich eine Translokation von Bax verhindert wurde.¹³⁷

Folgende Abbildung aus ¹²⁵ zeigt ein Modell wie Mitochondrien bei der Cholestase verändert und beteiligt sind.

Abbildung 7

1.3 Fragestellungen der Arbeit

1. Wirkt die β -Muricholsäure in primären Hepatozyten von Maus und Ratte, sowie in HepG2-Zellen antiapoptotisch?

Die β -Muricholsäure ist eine stark hydrophile Gallensäuren, deren choleretische und zellprotektiven Effekte *in vitro* und *in vivo* bereits demonstriert werden konnten. Allerdings existieren bisher keine Daten bezüglich einer möglichen anti-apoptotischen Wirkung bei Gallensäuren-induzierter Apoptose in Hepatozyten.

2. Welche Mechanismen spielen dafür eine ursächliche Rolle?

Ebenfalls unklar ist der zu Grunde liegende Pathomechanismus eines möglichen protektiven Effekts. Untersucht wurden daher insbesondere die Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials und die Bax-Translokation in HepG2-Zellen nach Behandlung mit Tauro- β Muricholsäure (T β MCA) in Kombination mit toxischen, hydrophoben Gallensäuren.

3. Wie reagieren Hepatozyten verschiedener Spezies auf hydrophobe und hydrophile Gallensäuren?

Das am häufigsten verwendete Tiermodell für experimentelle Cholestase ist die Ratte, gefolgt von der Maus. Ziel war es, Hepatozyten verschiedener Spezies hinsichtlich ihrer apoptotischen Eigenschaften zu vergleichen.

Dazu wurden primäre Hepatozyten von Ratte, Maus, Mensch und Hamster mit verschiedenen Gallensäuren inkubiert und gleichzeitig an verschiedenen Zeitpunkten die Apoptoserate gemessen.

2 Material

2.1 Puffer und Lösungen

- Blocking-Puffer: 5% Milchpulver o. 1% Milchpulver + 1% Albumin ad TBS-T
- 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 Puffer: 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 0,4 mmol/l KH₂PO₄, 0,2 mmol/l Na₂HPO₄, 25 mmol/l NaHCO₃, 0,5 mmol/l EGTA, 0,1 % D-Glucose; 37 °C; pH 7,4
- Hanks B Puffer 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 0,4 mmol/l KH₂PO₄, 0,2 mmol/l Na₂HPO₄, 25 mmol/l NaHCO₃, 0,4 mmol/l MgSO₄, 0,5 mmol/l MgCl₂, 3 mmol/l CaCl₂, 0,1 % D-Glucose; 37 °C; pH 7,4
- Lysepuffer: 20 mM Trias-HCL, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% Triton-X 100; 2 mM EDTA; Complete; 0,1 mM NaVO₃; 10 mM NaF
- DNA-Auftragspuffer (10x): 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA 1% SDS (w/v), 30 % Glycerin (w/v), 0,1 % Bromphenolblau (w/v); pH 8,0
- [³H]-TCA-Aufnahme-Puffer: 10 mM Hepes, 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5,5 mM D-Glucose; pH 7,5
- [³H]-TCA-Inkubationspuffer: 100 µl [³H]-TCA-Stop-Puffer, 10 µl [³H]-Taurocholat (3Ci/mM), 9,89 ml [³H]-TCA-Aufnahme-Puffer
- [³H]-TCA-Stop-Puffer: [³H]-TCA-Aufnahme-Puffer mit 1mM TCA
- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 6,6 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ (pH 7)
- TAE-Puffer (50x): 2 M Tris-HCl, 5,71 % Essigsäure, 0,1 M EDTA; pH 8,5
- SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
- SDS-Probenpuffer (2x): 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 25 % (w/v) Glycerin; 2% SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 5,3 % (v/v) β-Mercaptoethanol
- SDS-Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- SDS-Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- Essigsäure 5 %
- 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

2.2 Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)

- BioRad Protein Assay (BioRad, München)
- NucleoSpin RNA II (Machery-Nagel, Düren)
- QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden)
- Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7-Assay (Promega, Madison USA)
- WST-Assay für Zellviabilität (Invitrogen, Carlsbad USA)

2.3 Sonstige Materialen, Chemikalien und Geräte

- Brutschränke (Heraeus, Hanau)
- Cytofluor Series 4000 (PerSeptive Biosystems)
- Elektrophorese-/Transferkammern (Bio-Rad)
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135TV mit Axiocam MPm (Zeiss, Oberkochen)
- Heizblock (Eppendorf)
- Lichtmikroskop IX 50 (Olympus, Norwegen)
- Photoentwicklermaschine (Agfa)
- Pipetten (Eppendorf)
- Quantitativer PCR-Cycler RotorGene RG-3000 (Corbett Research, Australia)
- Sterilbank (Heraeus, Hanau)
- Tischzentrifuge 3200 (Eppendorf)
- Wasserbäder (Haake Fisions, GFL, Julabo)
- Whatman-Filterpapier (Whatman)
- Hyperfilm ECL von Amersham Biosciences (Buckingshamshire, UK)
- PVDF-Membran (0,45 µM Porengröße) und Sterifilter von Milipore (Bedford, USA)
- 40 % Acrylamid/Bis Solution 29:1 (3,3 % C), Protein Assay Farbstoff-Konzentrat und Protein-Marker für SDS-PAA-Gele von Bio-Rad (München)
- Höchst-Farbstoff von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
- Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Substrat und Puffer von Promega (Madison, WI, USA)
- Natrium-Pentobarbital (Narcoren) von der Firma Merial GmbH (Halbergmoos)

2.4 Antikörper

- polyklonaler Bcl-xL von Cellsignaling
- polyklonaler Bcl-2 von Cellsignaling
- polyklonaler Bad von Cellsignaling
- polyklonaler rabbit Bax Ab-8 von Neomarkers
- goat anti rabbit IgG-HRP
- goat anti mouse von SantaCruz
- polyklonaler Bax von Abcam (7977)
- Aktin
- GAPDH
- JC-1 (Fluoreszenzfarbstoff)
- DMSO, GCDCA, TUDCA, T β MCA

3 Methoden

3.1 Isolation und Gewinnung primärer Hepatozyten

3.1.1 Primäre Rattenhepatozyten

Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere befanden sich in Käfigen mit konstanter Temperatur von 24 °C und 12 h Tag/Nacht-Rhythmus. Freier Zugang zu Nahrung und Wasser war gewährleistet. Nach intraperitonealer Betäubung der Tiere mittels Natrium-Pentobarbital (Narcoren), wurde die Bauchdecke eröffnet und der Darm zur Seite geschoben. Daraufhin wurde die Leistenregion eröffnet und 0.05 ml Heparin in eine oberflächliche Inguinalvene injiziert. Im Anschluss wurde die V.portae kanüliert und die V.cava inf. ligiert. Die Leber wurde nun mit präoxygeniertem und auf 37°C temperierten Hanks A Puffer für ca. 10 min perfundiert. Um einen zu starken Druckanstieg in der Leber zu vermeiden, wurde die V.cava inf. kurz unterhalb der Ligatur eröffnet und ein freier Ablauf des Perfusats gewährleistet. Währenddessen wurde der Brustraum eröffnet, die V.cava sup. ebenfalls kanüliert, um dann die Leber im Rezirkulationsverfahren, mit nun verschlossener Ligation der V. cava sup., mit einem Collagenase enthaltenden Puffer (0,23 g/l) für weitere 5 min zu perfundieren, bis sich der Zellverband auflöst. Die Zellen wurden nun durch Schütteln in gekühltem Hanks B Puffer ausgelöst und anschließend durch ein Nylongewebe von 80 µm Maschenweite gesiebt. Durch Zentrifugation mittels Percoll Gradienten wurden die Zellen weiter gereinigt und der die toten Zellen enthaltende Überstand wurde verworfen.

3.1.2 Primäre Maushepatozyten

Männliche BL/6 - Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere befanden sich in Käfigen mit konstanter Temperatur von 24 °C und 12 h Tag/Nacht-Rhythmus. Freier Zugang zu Nahrung und Wasser war gewährleistet.

Nach intraperitonealer Betäubung der Tiere mittels Natrium-Pentobarbital (Narcoren) wurde die Bauchdecke eröffnet und der Darm zur Seite geschoben. Daraufhin wurde

die Leistenregion eröffnet und 0.02 ml Heparin in eine oberflächliche Inguinalvene injiziert. Aufgrund der kleineren Gefäßverhältnisse bei der Maus, wurde die Leber retrograd über die V. cava inf. perfundiert. Die V. portae diente als Abfluss, um zu hohe Druckverhältnisse zu vermeiden. Die V. cava sup. wurde, nach Eröffnung des Brustraumes ligiert, um eine optimale Perfusion der Leber zu gewährleisten. Die Leber wurde nun mit präoxygeniertem und auf 37°C temperierten Hanks A Puffer für ca. 10 min perfundiert, sowie im Anschluss mit einem Collagenase enthaltenden Puffer (0,23 g/l) für weitere 5 min perfundiert, bis sich der Zellverband auflöste. Die Zellen wurden nun durch Schütteln in gekühltem Hanks B Puffer ausgelöst und anschließend durch ein Nylongewebe von 80 µm Maschenweite gesiebt. Durch Zentrifugation mittels Percoll Gradienten wurden die Zellen weiter gereinigt und der die toten Zellen enthaltende Überstand wurde verworfen.

3.1.3 Primäre Hamsterhepatozyten

Männliche syrische Hamster wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere befanden sich in Käfigen mit konstanter Temperatur von 24 °C und 12 h Tag/Nacht-Rhythmus. Freier Zugang zu Nahrung und Wasser war gewährleistet.

Nach intraperitonealer Betäubung der Tiere mittels Natrium-Pentobarbital (Narcoren) wurde die Bauchdecke eröffnet und der Darm zur Seite geschoben. Daraufhin wurde die Leistenregion eröffnet und 0.05 ml Heparin in eine oberflächliche Inguinalvene injiziert. Im Anschluss wurde die V. portae kanüliert und die V. cava inf. ligiert. Die Leber wurde nun mit präoxygeniertem und auf 37°C temperierten Hanks A Puffer für ca. 10 min perfundiert, um einen zu starken Druckanstieg in der Leber zu vermeiden, wurde die V. cava inf. kurz unterhalb der Ligatur eröffnet und ein freier Ablauf des Perfusats gewährleistet. Währenddessen wurde der Brustraum eröffnet, die V. cava sup. ebenfalls kanüliert, um dann die Leber im Rezirkulationsverfahren, mit nun verschlossener Ligation der V. cava sup., mit einem Collagenase enthaltenden Puffer (0,23 g/l) für weitere 5 min zu perfundieren, bis sich der Zellverband auflöst. Die Zellen wurden nun durch Schütteln in gekühltem Hanks B Puffer ausgelöst und anschließend durch ein Nylongewebe von 80 µm Maschenweite gesiebt. Durch Zentrifugation mittels Percoll Gradienten wurden die Zellen weiter gereinigt und der die toten Zellen enthaltende Überstand wurde verworfen.

3.2 Kultivierung primärer Hepatozyten

3.2.1 Primäre Rattenhepatozyten

Die Zellen wurden in L-15 Medium (5% FCS , 15mmol/l HEPES pH 7,4, 2mmol/l L-Glutamin, 5mmol/l Glucose, 0,1 µmol/L Insulin, 0,1 µmol Dexamethason, Antibiotika und Antimykotika), des Weiteren in Williams E Medium (5 % FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 0,1 µmol/l Insulin, 0,1 µmol Dexamethason, Antibiotika und Antimykotika) supplementiert und zentrifugiert. Nach Trypanblau-Färbung lag der Anteil lebender Zellen im Mittel bei 90,7 %. Die Aussaat erfolgte in mit Collagen beschichteten Kulturgefäßen in supplementiertem L-15 Medium, sowie Williams E Medium. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C mit 5% (Williams E) und ohne (L-15) CO₂ Anteil. Nach 4- bzw. 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit den Gallensäuren, TLCA, GCDCA, TUDCA, TβMCA den Mischungen TLCA + TUDCA, GCDCA + TUDCA, GCDCA + TβMCA und DMSO (0,1 %) als Negativkontrolle, stimuliert. Innerhalb dieser Kultivierzeit wurden die Zellen nach 4 und 20 Stunden mit HBSS-HEPES gewaschen, sowie ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend erfolgte die Stimulierung durch Gallensäuren für 4 Stunden.

3.2.2 Primäre Maushepatozyten

Die Zellen wurden sowohl in L-15 Medium (5% FCS , 15mmol/l HEPES pH 7,4, 2mmol/l L-Glutamin, 5mmol/l Glucose, 0,1 µmol/L Insulin, 0,1 µmol Dexamethason, Antibiotika und Antimykotika), als auch in Williams Medium E (5% und 10% FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 0,1 µmol/l Insulin, 0,1 µmol Dexamethason, Antibiotika, Antimykotika) supplementiert und zentrifugiert. Nach Trypanblau-Färbung lag der Anteil lebender Zellen im Mittel bei 92, 5 %. Die Aussaat erfolgte in mit Collagen beschichteten Kulturgefäßen in supplementiertem L-15 Medium, sowie Williams Medium E. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C ohne (bei L-15) und mit 5% (bei Williams Medium E) CO₂ Anteil. Nach 4- und 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit den Gallensäuren, TLCA, GCDCA, TUDCA, TβMCA den Mischungen TLCA + TUDCA, GCDCA + TUDCA, GCDCA + TβMCA und DMSO (0,1%) als Negativkontrolle, stimuliert. Innerhalb dieser Kultivierzeit wurden die Zellen nach 4

und 20 Stunden mit HBSS-HEPES gewaschen, sowie ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend erfolgte die Stimulierung durch Gallensäuren für 4 Stunden.

3.2.3 Primäre Hamsterhepatozyten

Die Zellen wurden in Williams Medium E (5% FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 0,1 µmol/l Insulin, 0,1 µmol Dexamethason, Antibiotika) supplementiert und zentrifugiert. Nach Trypanblau-Färbung lag der Anteil lebender Zellen im Mittel bei 95,5 %. Die Aussaat erfolgte in mit Collagen beschichteten Kulturgefäßen in supplementiertem Williams Medium E. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C mit 5% CO₂ Anteil. Nach 2- und 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit den Gallensäuren, TLCA, GCDCA, TUDCA, den Mischungen TLCA+TUDCA, GCDCA+TUDCA und DMSO als Negativkontrolle, stimuliert. Innerhalb dieser Kultivierzeit wurden die Zellen nach 4 und 20 Stunden mit HBSS-HEPES gewaschen, sowie ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend erfolgte die Stimulierung durch Gallensäuren für 4 Stunden.

3.3 Kultivierung von HepG2-Ntcp Zellen

HepG2-Ntcp Zellen wurden in supplementiertem MEM von PAA (Pasching, Österreich) (minimal essential medium, 10 % fötales Kälberserum, 2 mmol/L L-Glutamin, 1mmol/L Na-Pyruvat, 1 % nichtessentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin und 1 g/l G418 Sulfat; pH 7,4, 37°C, 5 % CO₂) angezüchtet.

Ein Mediumwechsel erfolgte 2x pro Woche, 1x pro Woche wurde eine Zellpassage mit Trypsin/EDTA-1x-Lösung durchgeführt. Nach 24 Stunden Kultur wurden die Zellen für weitere 4 Stunden mit den Gallensäuren GCDCA (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), TUDCA (Calbiochem, Nottingham, Großbritannien) oder TβMCA (Steraloids, Newport, RI, USA) alleine oder in den Kombinationen GCDCA + TUDCA und GCDCA + TβMCA in einer Konzentration von 25 µmol/l, inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit DMSO (0,1%) inkubiert. Als zusätzliches toxisches

Agens diente die freie Fettsäure Palmitat, die alleine oder in Kombination mit T β MCA verwendet wurde.

3.4 Stabile Transfektion der HepG2 Zellen

Zur stabilen Transfektion mit Ratten-Ntcp wurden die HepG2 Zellen auf 6-Well-Platten aufgetragen. Dann wurden sie mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) transfiziert.¹³⁸ Um eine Auslese zugunsten der erfolgreich transfizierten Zellen zu ermöglichen, enthielt das transfizierte Plasmid zusätzlich ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geneticin.

Das Kulturmedium wurde durch je 2 ml serumfreies komplettes Medium ersetzt. Zur Herstellung des Transfektionsgemisches wurden 100 μ l Optimem + 5 μ l Fugene-Reagens (Roche, Mannheim, Deutschland) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 2 μ g der Plasmid-cDNA und eine weitere Inkubation für 20 Minuten. Nach 4-8 h erfolgte die Zugabe von 10 % FCS in jeweils 100 μ l des Transfektionsgemisch mit anschließender Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA für 5 Minuten inkubiert und zur Neutralisation MEM zugegeben. In 10 cm Petrischalen erfolgte nach 24 h die Zugabe von 1 mg Geneticin (G418) und die Anzüchtung für 14-21 Tage. Isolierte Klone wurden in je einer Vertiefung einer 24 Well-Platte ausgesät und mit 1 ml MEM und 1mg/ml Geneticin (G418) kultiviert. Dadurch wurde eine kontinuierliche Selektion zu Gunsten der effizienten transfizierten HepG2 Zellen erreicht. Nachdem die Zellen eine ausreichende Konfluenz erreicht hatten, wurden sie entweder tiefgefroren und wie weiter oben erwähnt für die Versuche weiterverwendet.

3.5 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 Homogeneous Caspase-3/7-Assay, Promega Corporation, Madison, WI, USA) verwendet.

Primäre Hepatozyten wurden 4h vor Durchführung des Caspase-3/7-Assay mit verschiedenen Gallensäuren stimuliert. Folgende Gallensäuren wurden verwendet;

GCDCA, TLCA, TUDCA und die Mischungen GCDCA mit TUDCA und TLCA mit TUDCA. Es wurden verschiedene Konzentrationen verwendet, ebenso wurde bei jedem Versuch eine Negativkontrolle (drei Vertiefungen) mit DMSO mitgeführt. Pro Versuchskonzentration wurden drei verschiedene Vertiefungen verwendet. Die Gallensäuren wurden, gemäß den unterschiedlichen Konzentrationen, in L-15 Medium, sowie Williams Medium E ohne Zusätze gelöst und anschließend wurden pro Vertiefung 50 µl der einzelnen Gallensäuren pipettiert. Nach 2 oder 4 h Stimulation bei 37°C wurden jeder Vertiefung 50 µl des Homogeneous Caspase-3/7-Testreagenz beigefügt. Dieses setzte sich zusammen aus dem (Z-DEVD)2-Rhodamin 110 Substrat, das 1:100 in dem Lysepuffer von Promega gelöst wurde. Nach Zugabe der Testreagenz wurde die 96-Well-Platte für ca. 30 min bei RT auf einem Plättenschüttler bis zum Ablesezeitpunkt durchgemischt. Die Messung erfolgte in einem Fluorimeter (Zytofluor, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) bei einer Exzitationslänge von 485+/-20 nm und einer Emissionslänge von 530+/-25 nm. Die 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, so dass die intrazellulären Stoffe in das Medium freigesetzt werden. Durch die freigesetzten aktivierte 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 der Probe.

3.6 Hoechst 33342-Färbung

Die auf 12-Well-Platten ausgesäten Zellen wurden nach 4 h und 24 h Kultur stimuliert. Die Stimulierung erfolgte durch Gallensäuren in verschiedenen Konzentrationen, welche in L-15 Medium oder Williams Medium E ohne Zusätze gelöst wurden. Pro Well wurden 500 µl der Gallensäuren beigefügt. Nach 2- oder 4-stündiger Stimulation bei 37°C wurden Gallensäuren mit PBS gewaschen und anschließend das Hoechst-Reagenz, 1:2000 mit PBS verdünnt, beigefügt. Im Fluoreszenzmikroskop konnte der Grad der Zellfragmentierung festgestellt werden.

3.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung erfolgte mit dem BioRad Protein Assay der Firma BioRad (München). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt. Die Proteinproben wurden wie folgt verdünnt, 1µl Zelllysat 1:800 in ddH₂O. 800 µl verdünnte Proteinproben wurden anschließend mit 200 µl Farbstoff-Konzentrat vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Reagenz gevortext und die fertigen Reaktionslösungen wurden in Küvetten umgefüllt. Bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde die Extinktion ermittelt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Vergleich mit den Standardverdünnungen.

3.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

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

Zu Anfang wurde das Trenngel/Sammelgel angesetzt, bestehend aus 40%igem (w/v) Acrylamid/N'N'-Methylen-Bis-Acrylamid, Trengelpuffer/Sammelgelpuffer, ddH₂O und SDS. Meistens wurden 10 bis 15%ige Trenngele und 3 oder 4%ige Sammelgele verwendet. Nachdem die Bestandteile des Gels in eine Saugflasche pipettiert wurden, entgasten wir diese für 15 min. Nach Zugabe von 10 µl APS 33% und 10 µl TEMED zum Trenngel, mischten wir das Gel vorsichtig und gossen es zwischen 2 Glasscheiben und überschichteten es nun mit Isopropanol 60%. Die Polymerisation des Trenngels dauerte ca. 30 min, während dieser Zeit wurde das Sammelgel gemischt, wiederum 15 min entgast, 10 µl APS 33% und 5 µl TEMED zugegeben und vorsichtig gemischt. Das Sammelgel wurde nun ca. 1 cm auf das schon polymerisierte und mit ddH₂O gespülte Trenngel gegossen, und ein Kamm hineingesteckt, damit sich die späteren Probenauftragstaschen bilden konnten. Nach ca. 90 min Polymerisation wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und die

Platten in eine Vertikal-Elektrophoresekammer (BioRad) eingebaut. Diese wurde nun mit SDS-haltigem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben wurden, bevor sie in die Probenauftragstaschen pipettiert wurden, mit 2xSDS –Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und 1 min in der Tischzentrifuge (8000 RCF) zentrifugiert. Nun wurde eine Spannung von 150 V für ca. 1 h angelegt, so dass die durch das SDS denaturierten und stark geladenen Proteine zur Anode wanderten. Am Ende des Vorgangs haben sich die Proteine im Trenngel, nach im ihrem spezifischen Molekulargewicht aufgetrennt.

3.9 Western-Blot

Der Western-Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine durch Antikörper auf Trägermembranen. Die Proteine wurden hierfür in einem Proteingemisch mit Hilfe des SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderen Eigenschaften aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidifluorid) übertragen.

Die PVDF-Membran, auf die Gelgröße zugeschnitten, wurde zunächst für 15 sec in Methanol 100% eingeweicht, dann für 2 min in ddH₂O gewaschen und zuletzt in den Membranpuffer eingelegt.

Wir verwendeten das semi-dry Verfahren, bei dem auf eine Graphitkathode 3 Lagen Whatmann-Filterpapier gelegt wurden. Darauf folgte das Gel, die PVDF-Membran, wiederum 3 Lagen Whatmann-Filterpapier und die Graphitanode. Nach Anlegen von einer Stromstärke von 0,05 A pro Gel für 60 min wandern die Proteine von der Kathode zur Anode, d.h. sie verließen das Gel und wurden auf die Membran transferiert. Um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde sie für ca. 60 min im passenden Blockierungspuffer bei RT geschüttelt. In unserem Fall waren dies 5% (w/v) Magermilchpulver bzw. 1% Magermilchpulver mit 1% Albumin, jeweils gelöst in TBS-T. Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären, für das Protein jeweils spezifischen Antikörper, inkubiert. Dafür wurde die Membran in ein Zentrifugengefäß mit 2 ml Antikörerverdünnung im passenden Blockierungspuffer gegeben und bei 4°C über Nacht unter Rollen gelagert, so dass die Membran komplett umspült werden konnte. Anschließen wurde die Membran mindestens 3-mal für je 5 min mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper wieder zu entfernen. Danach wurde die Membran mit einem sekundären, gegen den primären

gerichteten, Antikörper für 60 min bei RT, wiederum unter Rollen, hybridisiert. Dieser sekundäre, HRP („horseradish peroxidase“)-gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls im passenden Blockierungspuffer, in geeigneter Verdünnung, eingesetzt. Anschließend wurden die Signale durch Chemolumineszenz detektiert, indem die Membran für 1 min mit 10 ml der ECL-Lösung (Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1) inkubiert wurde. Die mit einer Seran-Folie überzogenen Membranen wurden in einer Entwicklerkassette für verschiedene Zeitintervalle (5 sec bis 5 min) belichtet und die Filme nachfolgend in der Entwicklermaschine entwickelt.

Um auf der gleichen Membran noch weitere Proteine zu untersuchen, mussten die hybridisierten Antikörper von der Membran abgelöst werden, was auch als „Stripping“ bezeichnet wird. Dazu inkubierten wir die Membran für 2x10 min in Essigsäure 5% unter Schütteln. Danach wurde die Membran 5 bis 6 mal für je 5 min gewaschen, 60 min im passenden Blockierungspuffer geblockt und dann mit dem für das Protein spezifischen Antikörper erneut hybridisiert.

3.10 Mitochondriales Membranpotential

Der lipophile, kationische Fluoreszenzfarbstoff JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazol-carbocyaniniodid) wird weitgehend spezifisch von den Mitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotential aufgenommen. Ein höheres Membranpotential $\Delta\Psi_m$ bewirkt dabei eine vermehrte Einlagerung und Konzentrierung des Farbstoffes in den Mitochondrien. In geringer Konzentration liegt der Farbstoff als Monomer vor und zeigt dabei ein Emissionsmaximum im grünen Wellenlängenbereich. Hohe Konzentrationen bewirken die Bildung von sogenannten J-Aggregaten (bathochromer Effekt: Verschiebung zu größeren Wellenlängen) bei einer Verschiebung des Emissionsmaximums in den roten Wellenlängenbereich. Gesunde Zellen weisen ein hohes $\Delta\Psi_m$ auf. Bei beginnender Apoptose werden die Mitochondrien depolarisiert, $\Delta\Psi_m$ sinkt ab, dargestellt durch eine Abnahme der roten Emission. Der Quotient aus roter und grüner Emission ist somit ein Maß für das mitochondriale Membranpotential, unabhängig von der mitochondrialen Masse.

Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen werden in einer Stärke von $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in mit Poly-I-Lysin beschichteten 96-Well-Kulturgefäßen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgt Mediumwechsel auf serumfreies MEM und Stimulierung mit GCDCA, TUDCA, T β MCA oder GCDCA mit TUDCA bzw. T β MCA in äquimolaren Konzentrationen von

25, 50 oder 100 μ mol/l für 2, 4 oder 6 Stunden. Unbehandelte (nicht serumfreie) Zellen gelten als Referenzpunkt. Nach Inkubation werden die Zellen mit 2 μ mol/l JC-1 in MEM inklusive 0,2% (v/v) DMSO für 30 Minuten gefärbt und zweimal mit HEPES stabilisierten HBSS gewaschen. Im Fluorometer (Cyto-Fluor 4000) wird bei 485 nm Anregungswellenlänge die Emission bei 580 nm und 530 nm bestimmt. Die Eigenfluoreszenz der gefärbten Wells ohne Zellen wird vom Messwert subtrahiert, der Quotient aus roter und grüner Emission berechnet.

3.11 Mitochondriale Translokation von Bax

Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen wurden unter Standardbedingungen bis zu einer Dichte von 70 % kultiviert. Im Anschluss wurde das vorhandene Medium aspiriert und durch reines MEM für 90 Minuten ersetzt. Nun wurden die Zellen gewaschen und mit einem eisgekühlten Homogenisierungspuffer (250 mmol/L Saccharose, 20 mmol/L Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 2 mmol/l EGTA, 10 mmol/L Leupeptin, 25 mg/L Aprotinin, 10 mmol/L 2-Mercaptoethanol, 1 mmol/L PMSF, pH 7,4) abgeerntet. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen mit einem Potter-Elvehjem PTFE Stößel durch 30 Stöße homogenisiert. Das Absetzen der Kerne wurde durch eine Zentrifugation bei 600 RCF für 5 Minuten erreicht, die Mitochondrien und das Zytosol konnten durch 10.000 RCF für 10 Minuten aufgetrennt werden. Im nächsten Schritt wurden die Mitochondrien passend zum Volumen des Zytosols in einen Homogenisierungspuffer resuspendiert (1:1). Die Proben wurden nun durch einen Loadingpuffer ergänzt, auf 95 °C erhitzt und auf ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel aufgeladen. Nach der Elektrophorese und dem Transfer auf die PVDF Membranen (Millipore, Bedford, MA, USA) folgte das Blocken der Proben mit 5 %igen Milchpulver, sowie die Inkubation mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der gegen das humane Bax gerichtet ist (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). In der abschließenden Densitometrie konnte das Verhältnis des mitochondrialen und zytosolischen Bax-Anteils gemessen werden.

3.12 Statistik

Sämtliche Ergebnisse der Experimente wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit der Varianzanalyse für wiederholte Testung (ANOVA) beschrieben. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel von Microsoft.

4 Ergebnisse

4.1 *β-Muricholsäure besitzt anti-apoptotische Eigenschaften*

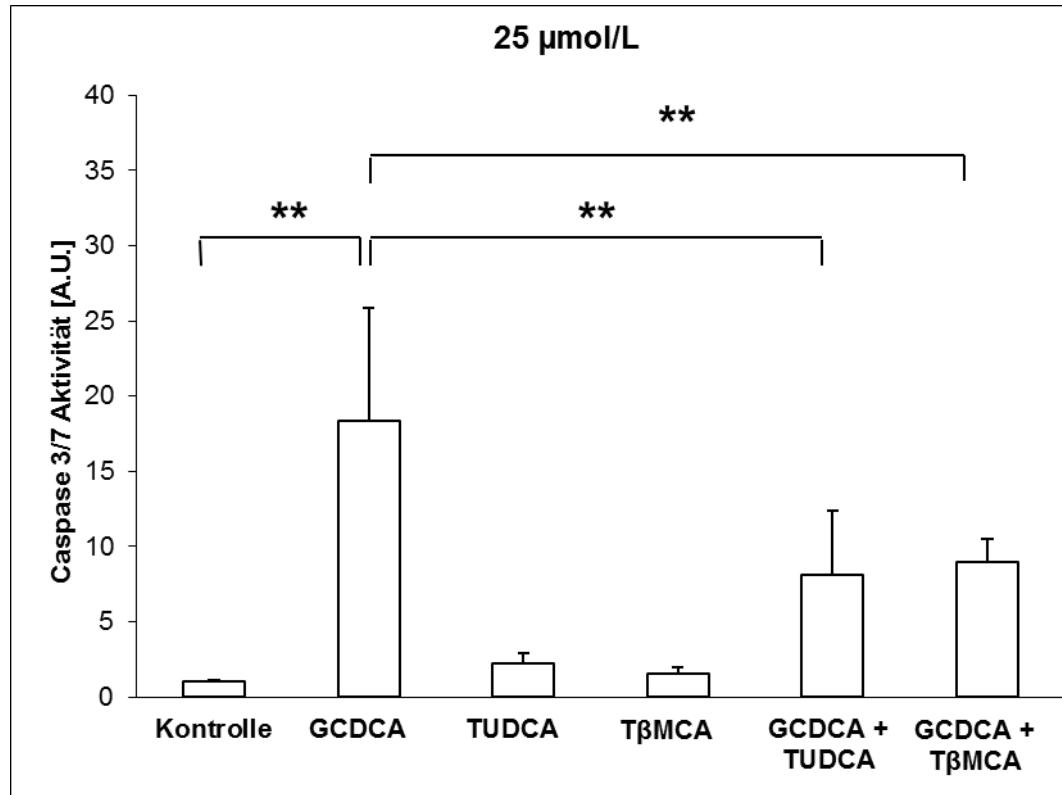
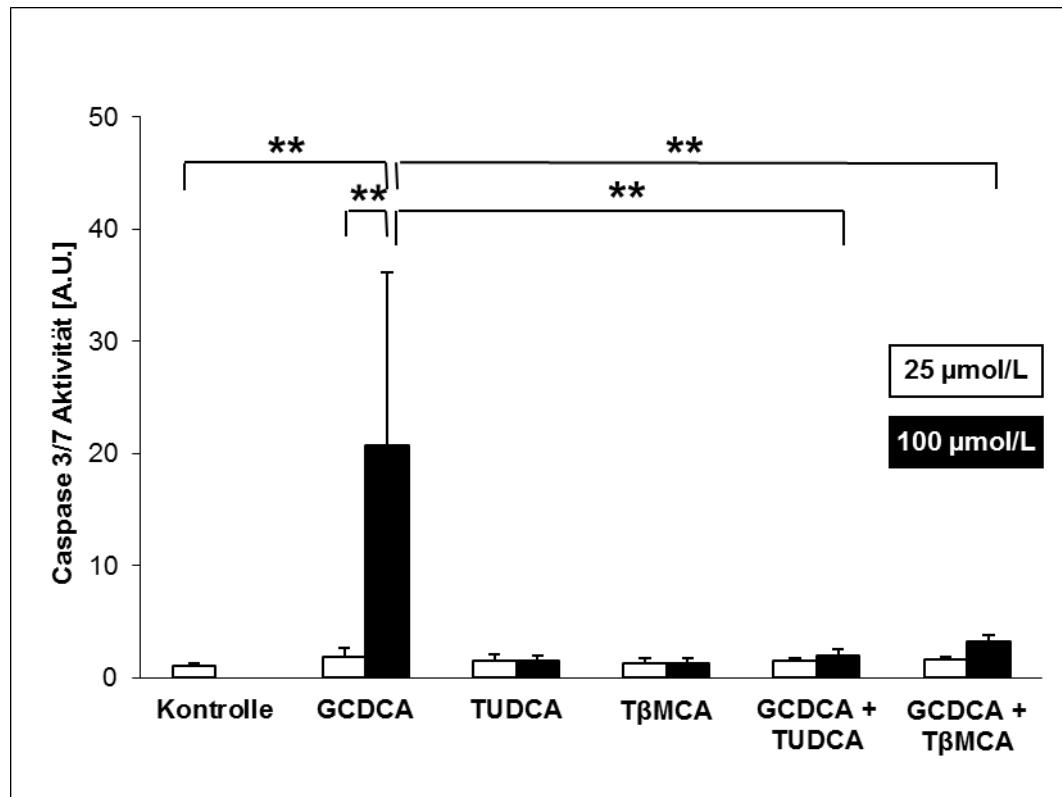
Eingangs wurde bereits die βMCA näher beschrieben und wie dort erwähnt ist sie eine sehr hydrophile Gallensäure. Auch wurden bereits protektive Eigenschaften in Bezug auf cholesterinhaltige Gallensteine *in vivo* und *in vitro* beschrieben. In den folgenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Taurin-konjugierte βMCA (TβMCA) zusätzlich anti-apoptotische Fähigkeiten besitzt und diese sehr wahrscheinlich über mitochondriale Mechanismen vermittelt werden.

4.1.1 GCDCA-induzierte Apoptose wird durch TβMCA vermindert

Wie auch schon aus früheren Arbeiten bekannt, führt die hydrophobe GCDCA in niedrigen mikromolaren Konzentrationen zu hepatzellulärer Apoptose.⁸⁵ In den von uns verwendeten HepG2-Zellen kam es unter GCDCA zu einem 19-fachen Anstieg der Zellschädigung im Vergleich zu den Kontrollen, abgelesen durch die vorhandene Caspase 3/7-Aktivität (Abbildung 8A).

Auch in den primären Zelllinien von Ratte und Maus zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Apoptose, ausgelöst durch GCDCA nach einer Inkubationszeit von 4 h (Abbildung 8 B+C). Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass bei den primären Zellen wesentlich höhere Konzentrationen der Gallensäuren nötig waren, um einen vergleichbaren apoptotischen Effekt zu erreichen (100 vs. 25 µmol/l).

Im Gegensatz zur GCDCA hatten die hydrophileren Gallensäuren TUDCA und TβMCA keine nennenswerten apoptotischen Eigenschaften. Es konnte sogar demonstriert werden, dass TUDCA und TβMCA in der Lage sind, den Zellschaden zum einen in einer Hepatomzelllinie und zum anderen in primären Zellen von Ratte und Maus signifikant zu verringern (Abbildung 8 A-C). Dieser protektive Effekt war bei den Nagern noch stärker ausgeprägt als bei den HepG2-Zellen.

A**B**

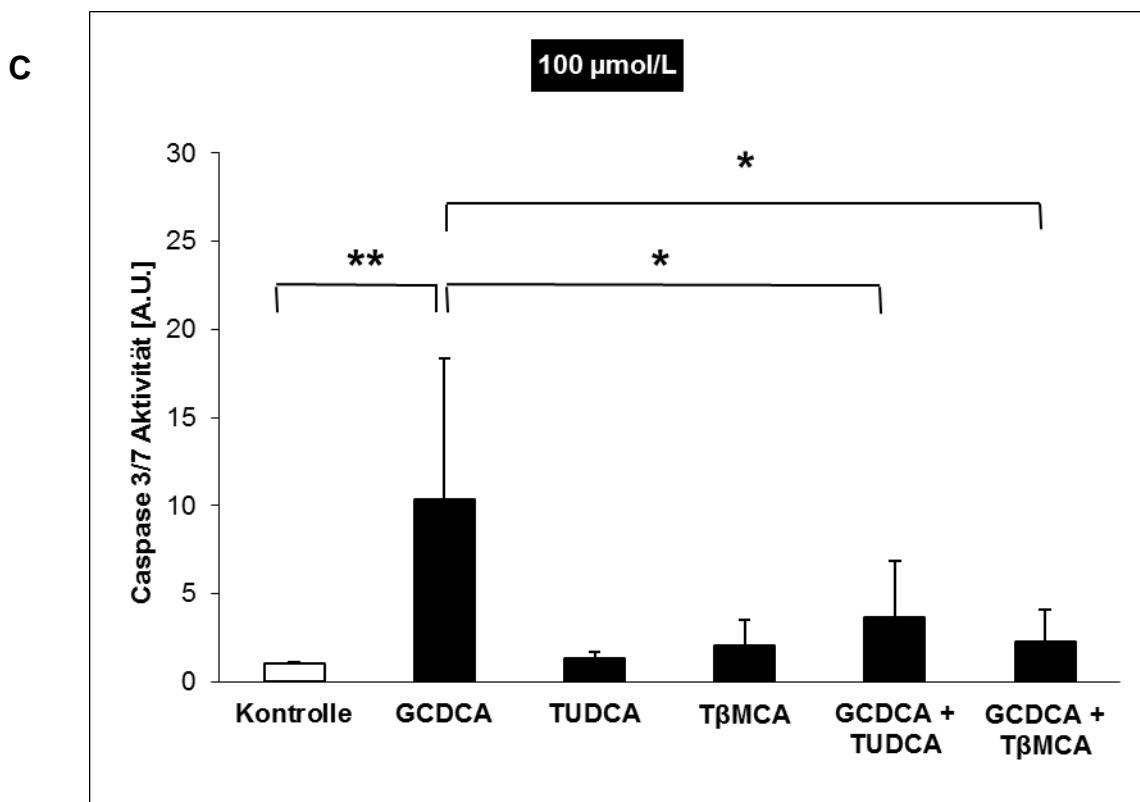


Abbildung 8. Tauro- β -Muricholsäure schützt Hepatozyten verschiedener Spezies vor Glycochenodecholsäure-induzierter Apoptose. In humanen Hep-G2 Zellen (A) induziert GCDCA in einer Konzentration von 25 µmol/L signifikant Apoptose nach vier Stunden Inkubation. Ähnliche Effekte können in den primären Hepatozyten von Ratte (B) und Maus (C) beobachtet werden. Allerdings ist für diesen Effekt mit 100 µmol/L bei den Nagern eine höhere Konzentration notwendig. In allen Versuchsvarianten konnte gezeigt werden, dass die hydrophilen Gallensäuren Tauroursodeoxycholsäure und T β MCA diese Apoptose signifikant reduzieren können. Die Apoptoserate wurde durch Messung der Caspase 3/7 Aktivität bestimmt. (MW ± SD, n=3-6, *p<0,05, **p<0,01)

Als weiterer Marker für Zellschäden wurde die Höchst 33342 Färbung und damit die nukleäre Fragmentation herangezogen. Hier konnte gezeigt werden, dass die mit GCDCA inkubierten Zellen eine signifikant höhere Kernfragmentation zeigten als die mit den hydrophilen Gallensäuren TUDCA und T β MCA inkubierten. Sowohl TUDCA, als auch T β MCA waren zusätzlich in der Lage, die durch GCDCA ausgelöste Fragmentation zu verhindern. In der Literatur finden sich bisher keine vergleichbaren Daten, die den antiapoptotischen Effekt der T β MCA in dieser Weise darstellen.

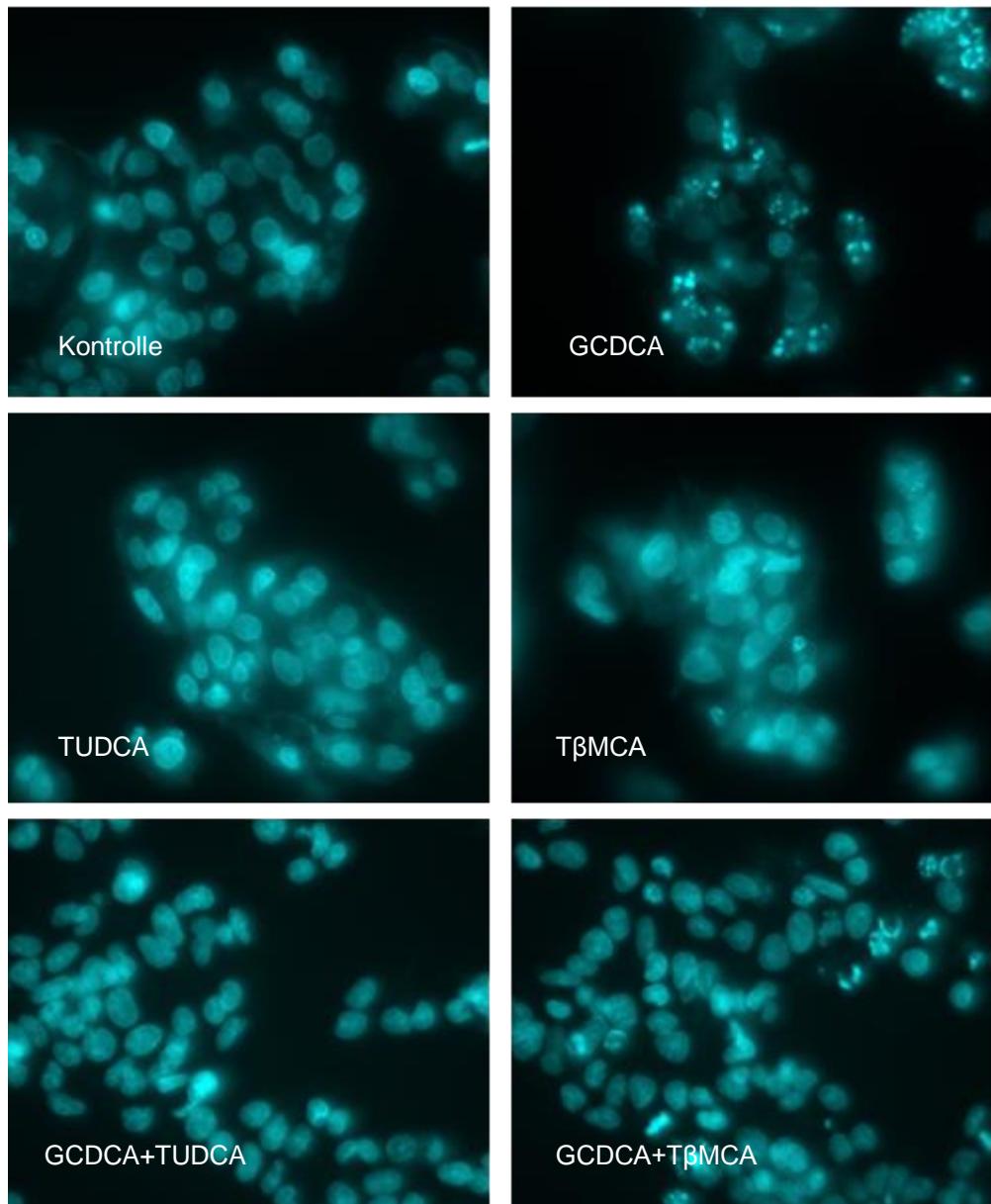


Abbildung 9. Nukleare Zellfragmentation durch GCDCA und die Reduktion durch hydrophile Gallensäuren. Wie bereits in Abbildung 8 demonstriert führt die hydrophobe Gallensäure GCDCA zu Apoptose. In dieser Abbildung wird diese Apoptose in HepG2 Zellen durch eine Höchst 33342 Färbung illustriert. Die Inkubation mit GCDCA führt zu einer Fragmentation, wohingegen TUDCA und T β MCA diese Effekte vermindern können. Die Konzentration der Gallensäuren betragen für jede 25 μ mol/L. 40-fache Vergrößerung.

4.1.2 β -Muricholsäure schützt in primären Hepatozyten von Nagern vor Apoptose

β MCA ist bei Nagern physiologischerweise in der Leber vorhanden, was die Widerstandsfähigkeit gegenüber Gallensäuren-induzierter Apoptose erklären könnte. In der menschlichen Leber ist hingegen keine β MCA vorhanden.⁶⁰ In den von uns durchgeführten gaschromatographischen Messungen (siehe nachfolgende Tabellen 1 und 2) konnten wir hohe Anteile der Muricholsäure (α - und β -Muricholsäure) in Lysaten von primären Maus- und Rattenhepatozyten nachweisen. In den untersuchten Proben wurden die höchsten Werte für die Muricholsäure in denjenigen Hepatozyten ermittelt, die zuvor mit GCDCA oder TCDCA behandelt wurden. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Ratten und Mäuse Chenodeoxycholsäure und deren Konjugate in die nicht schädliche Muricholsäure umwandeln können.⁶⁶ Weiterhin erklärt diese Metabolisierung zumindest teilweise die Tatsache, dass die Hepatozyten von Ratten und Maus wesentlich resistenter gegenüber GCDCA-induzierter Apoptose waren, als dies bei HepG2-Zellen zu beobachten war (s. 4.1.1).

Tabelle 1A: Primäre Maushepatozyten

	Muricholsäure (nmol/g protein)
Kontrolle	165,3 SD 111,2
TCDCA	432,4 SD 250,5
GCDCA	686,4 SD 192,9
TUDCA	161,7 SD 109,5

p< 0,01 Kontrolle vs. GCDCA; p< 0,01 TUDCA vs. GCDCA

Tabelle 1B: Primäre Rattenhepatozyten

	Muricholsäure (nmol/g protein)
Kontrolle	72,5 SD 23,4
TCDCA	598,5 SD 239,1
GCDCA	863,9 SD 130,9
TUDCA	304,2 SD 124,8

p<0,01 Kontrolle vs. TCDCA, Kontrolle vs. GCDCA, TUDCA vs. GCDCA; p<0,05 TUDCA vs. TCDCA

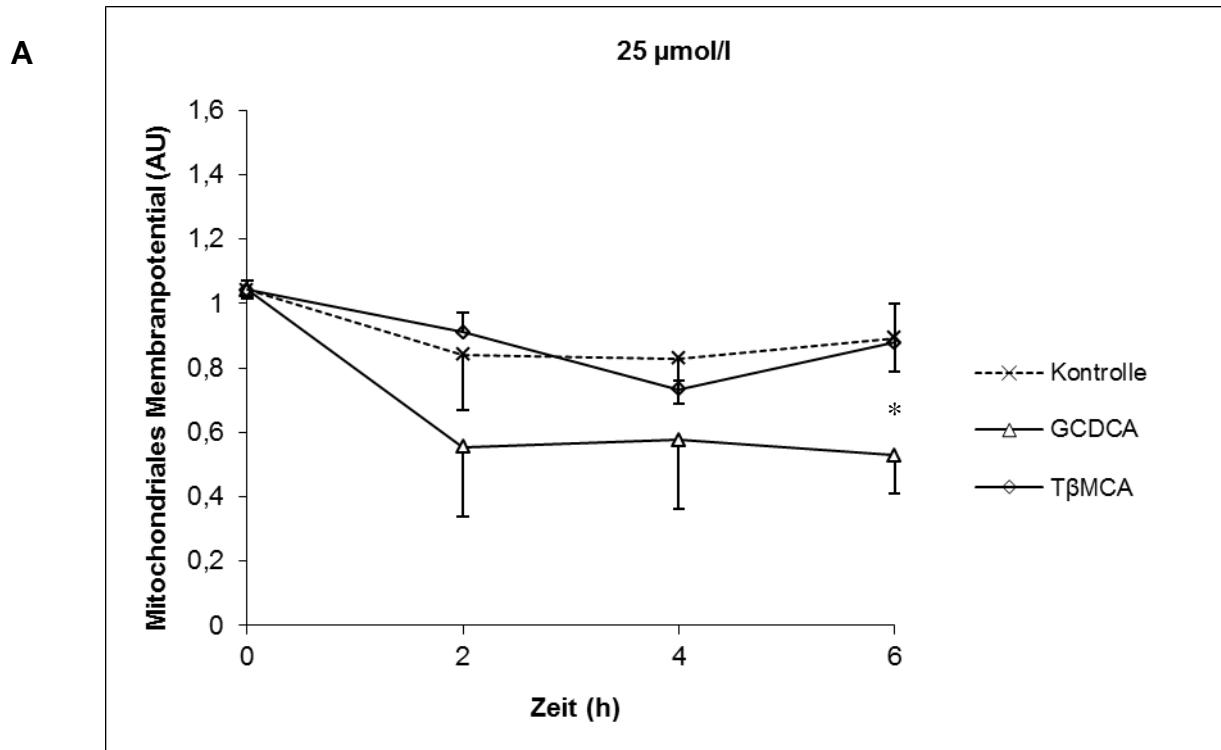
Tabelle 1 Quantitativer Anteil von Muricholsäure in primären Hepatozyten. Die Muricholsäure ist in dieser Tabelle zusammengefasst aus α und β Muricholsäure gemessen mittels Gaschromatographie in primären Maushepatozyten (A) und Rattenhepatozyten (B). Hohe Anteile sind in denjenigen Lysaten vorhanden, die mit GCDCA oder TCDCA behandelt wurden. Ein Indikator für die Tatsache, dass Nager Chenodeoxycholsäure in Muricholsäure umwandeln können und so möglicherweise resistenter gegenüber GCDCA-induzierter Apoptose sind (n=3).

4.1.3 TβMCA stabilisiert das mitochondriale Membranpotential bei GCDCA-induzierter Apoptose

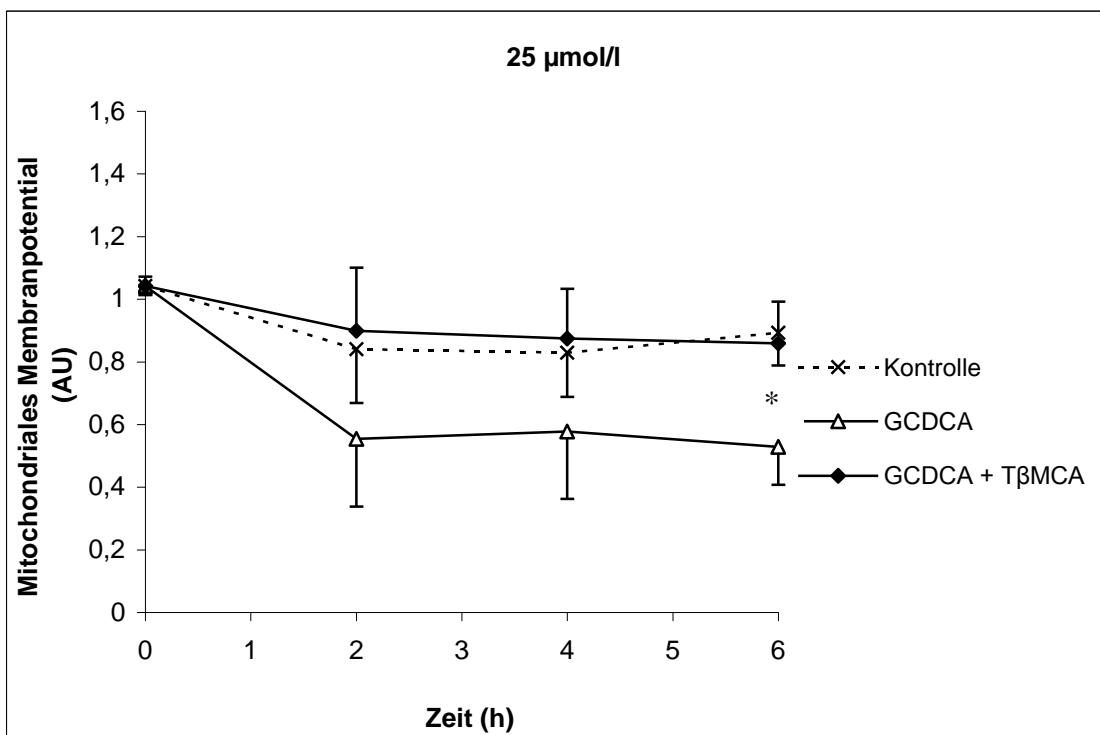
Es sei nochmals erwähnt, dass das mitochondriale Membranpotential (MMP) ein wichtiger Marker der Zellvitalität ist, da es als Parameter für den Austausch von Wasserstoffionen entlang der inneren Mitochondrienmembran gilt und damit eine ausreichende ATP Produktion anzeigt. Die Gallensäure GCDCA beeinträchtigt das MMP je nach eingesetzter Dosis und führt zu einem Schaden der Zelle.⁸⁶ In dieser Arbeit konnte bestätigend gezeigt werden, dass die Inkubation von HepG2-Zellen mit GCDCA in einer Konzentration von 25 µmol/l zu einer Fluoreszenzänderung in der JC-1 Färbung der Zellen führt (Abbildung 10A). Dies ist mit einem Zusammenbrechen des MMP gleichzusetzen. Die hydrophile TβMCA hatte keinerlei

Einfluss auf die Stabilität des MMP. Viel mehr konnte die hydrophile Gallensäure das MMP während einer gleichzeitigen Inkubation mit GCDCA stabilisieren (Abbildung 10B). Auch höhere Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ zeigten die gleichen protektiven Effekte.

In Fluoreszenzmikroskopie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das MMP Signal nach Inkubation mit GCDCA als Zeichen des Stabilitätsverlustes abnimmt (Abbildung 10C). Auch in diesem Versuchsaufbau hatte die T β MCA einen schützenden Effekt auf das MMP.



B



C

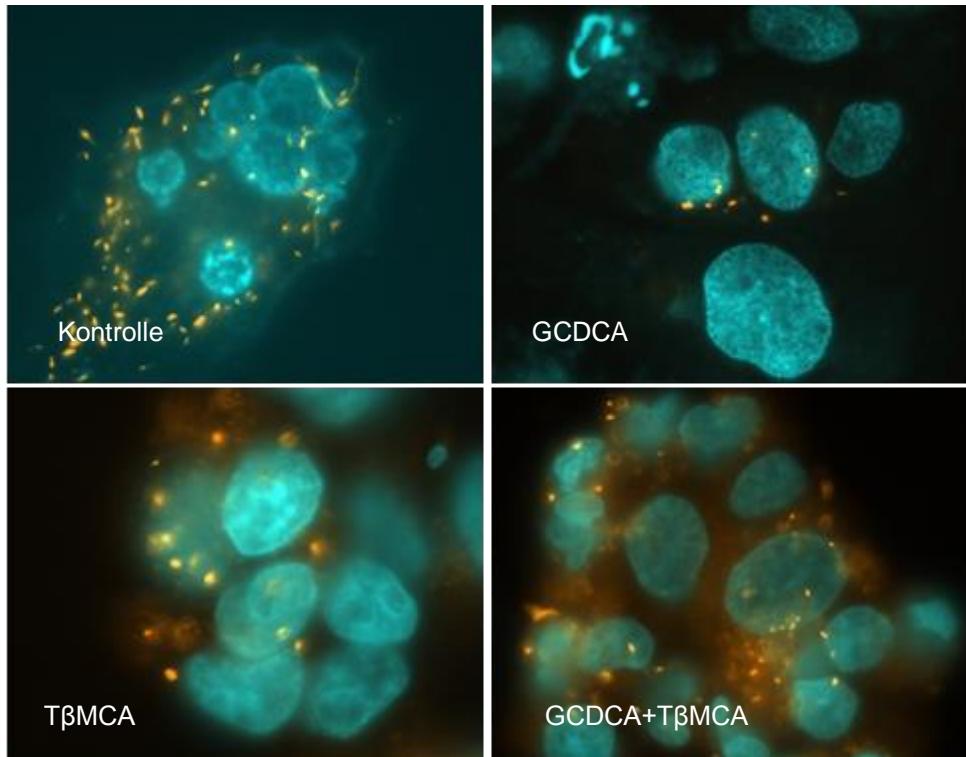
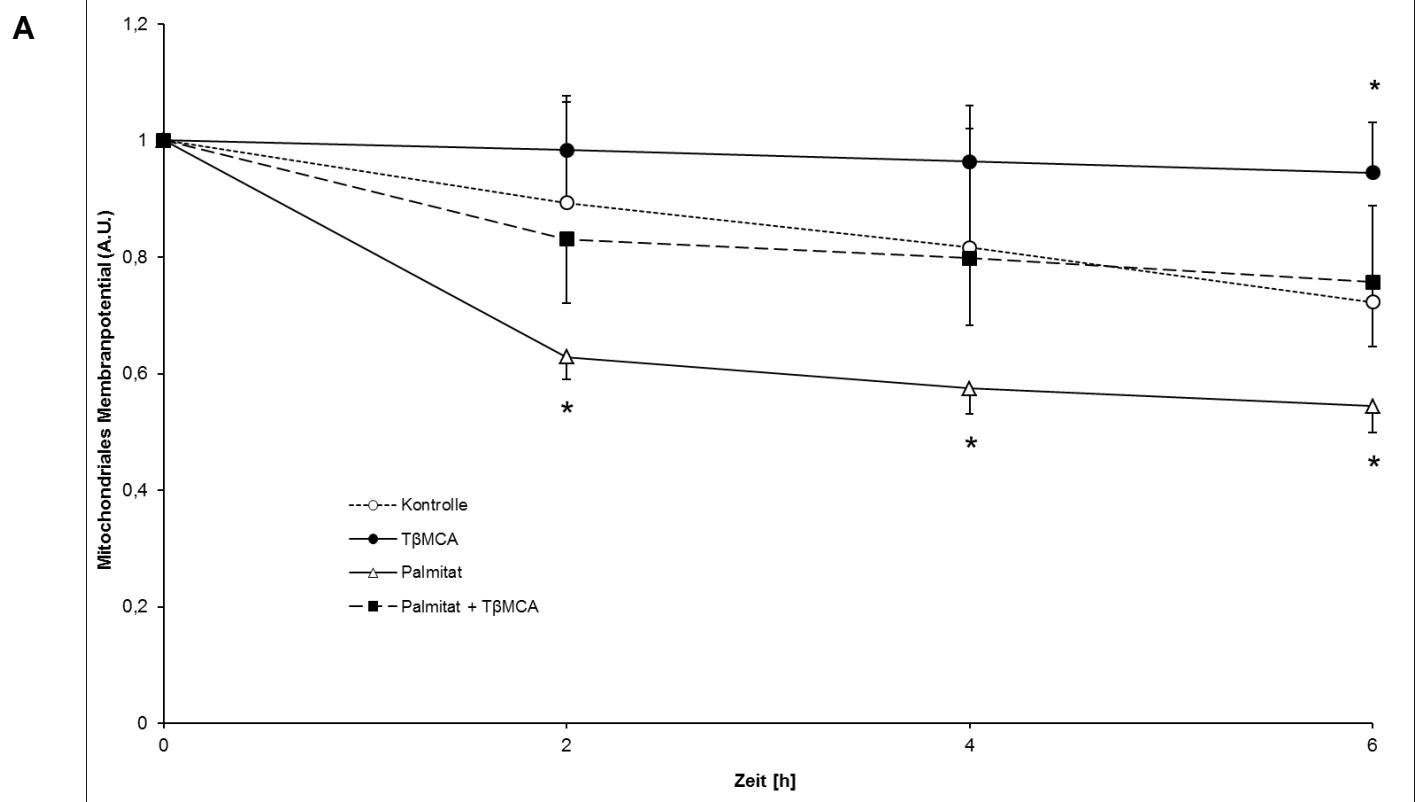


Abbildung 10. Tauro- β -Muricholsäure stabilisiert das durch GCDCA herabgesetzte mitochondriale Membranpotential (MMP). In HepG2 Zellen wurde das (MMP) durch Fluoreszenzänderungen in einer JC-1 Färbung gemessen. Die Inkubation der Zellen mit GCDCA führt zu einem Zusammenbrechen des MMP (A, *p<0,05 vs. Kontrolle). Bei gleichzeitiger Inkubation mit T β MCA kommt es zu einer signifikanten Stabilisierung des MMP (B, *p<0,05 vs. GCDCA + T β MCA). Gallensäurenkonzentration 25 μ mol/L (n=4). In C sind die Mitochondrien von Hep G2 Zellen mit JC-1 angefärbt (orange) und mittels Fluoreszenzmikroskopie fotografiert. (Vergrößerung 100-fach). GCDCA reduziert das mitochondriale Signal. T β MCA führt hier ebenfalls zu einer Stabilisierung von diesem Effekt. Demonstriert ist ein repräsentatives Foto aus n=4 Versuchen.

4.1.4 T β MCA stabilisiert das mitochondriale Membranpotential auch bei Palmitat-induzierter Apoptose

Wie unter 4.1.3 demonstriert, kann die T β MCA das MMP bei GCDCA-induzierter Schädigung stabilisieren. Nun galt es die Tatsache zu prüfen, ob die T β MCA nur bei dieser spezifischen Ursache der Apoptose protektiv ist. Dafür wurden HepG2 Zellen mit der freien Fettsäure Palmitat in einer Konzentration von 200 μ mol/l inkubiert, was zu einer starken Beeinträchtigung des MMP führte. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Behandlung mit T β MCA wiederum schützend wirkt. Daher wirkt T β MCA nicht nur bei Gallensäuren-induzierter Apoptose protektiv und anti-apoptotisch.



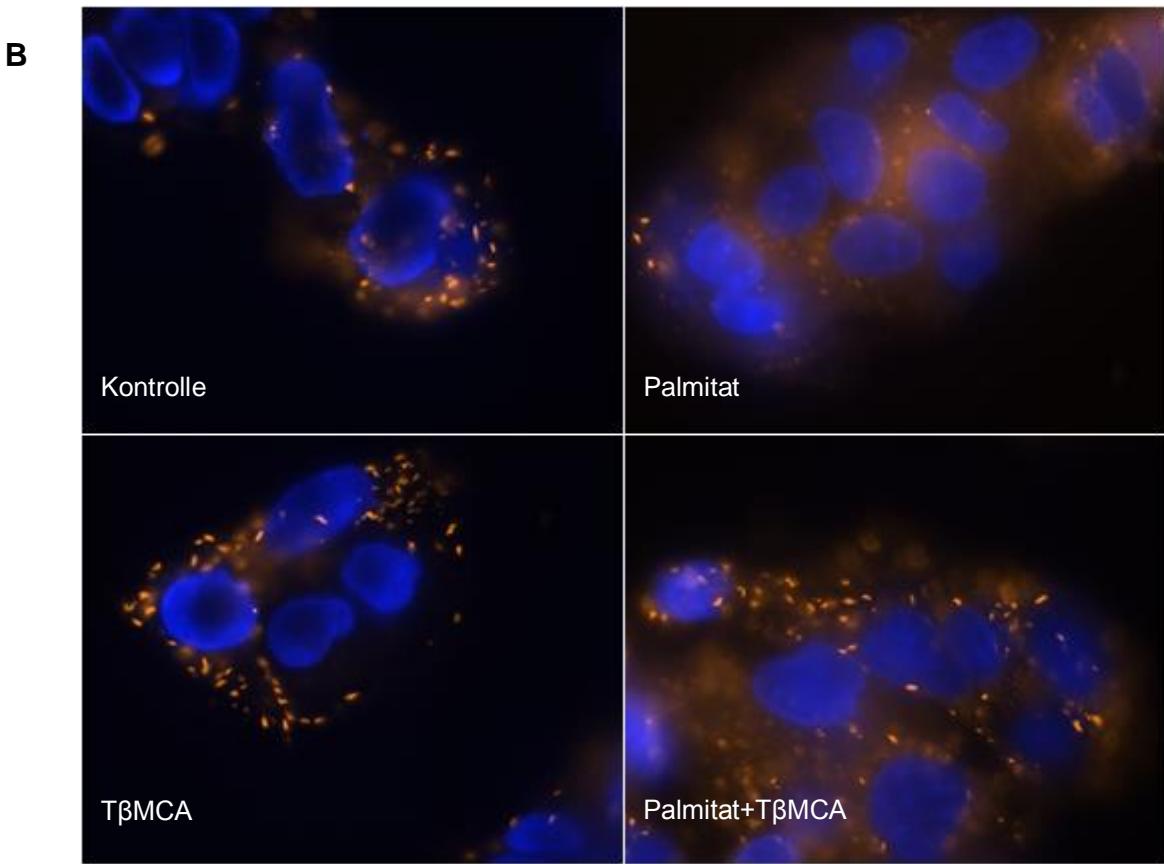


Abbildung 11. Tauro- β -Muricholsäure verhindert eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials durch Palmitat. Das MMP wird mittels Fluoreszenzfärbung JC-1 in Hep G2 Zellen detektiert. Palmitat in einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/L}$ führt zu einer deutlichen Herabsetzung des MMP, welches durch die hydrophile Gallensäure T β MCA (25 $\mu\text{mol/L}$) stabilisiert wird. (A, n=7, *p<0,05 vs. verschiedene Varianten). Auch wird durch Palmitat das mitochondriale Signal in der JC-1 Färbung vermindert. Durch T β MCA wird dies wieder aufgehoben (B, demonstriert ist ein repräsentatives Foto aus n=4 Versuchen, 100-fache Vergrößerung).

4.1.5 T β MCA verhindert die Translokation des proapoptotischen Bax

Die hydrophobe Gallensäure GCDCA führt zu einer verstärkten Translokation des proapoptotischen Proteins Bax vom Zytosol zu den Mitochondrien. Dies konnte in HepG2 Zellen mittels Western Blot und anschließender Densitometrie gezeigt werden. GCDCA wurde dabei in Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt, bereits nach 30 Minuten wurde dieser Effekt statistisch signifikant. Durch die Inkubation mit der hydrophilen T β MCA konnte auch nach längerer Inkubation (30, 60 und 90 min) keine Translokation erreicht werden. Zusätzlich zeigten sich auch in diesem Fall die antiapoptotischen Eigenschaften von T β MCA, da eine wiederum durchgeführte Simultaninkubation mit GCDCA die von dieser ausgelösten Translokation von Bax verhindert werden konnte.

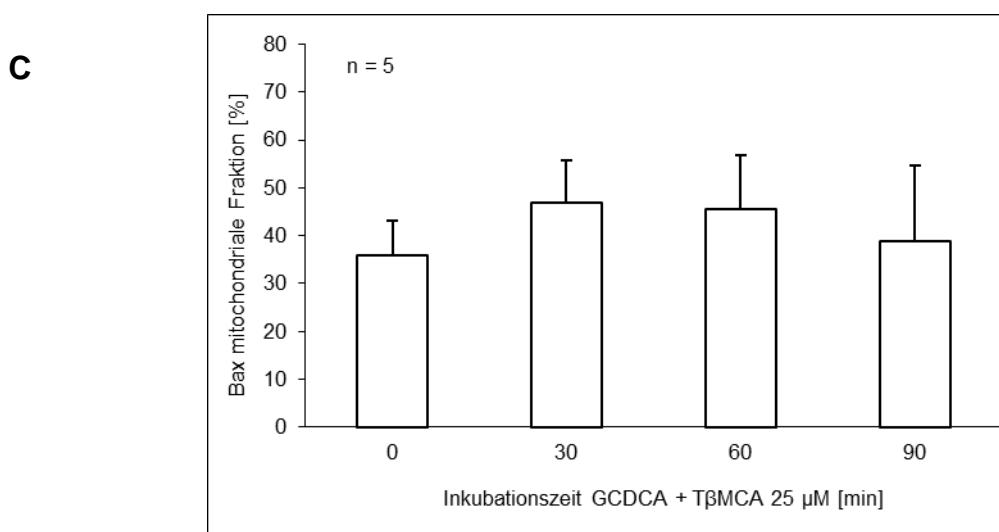
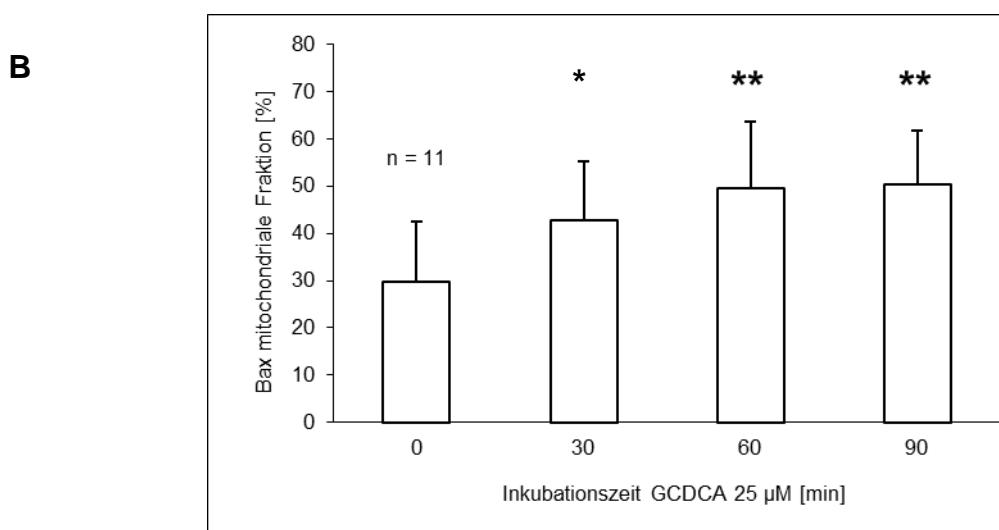
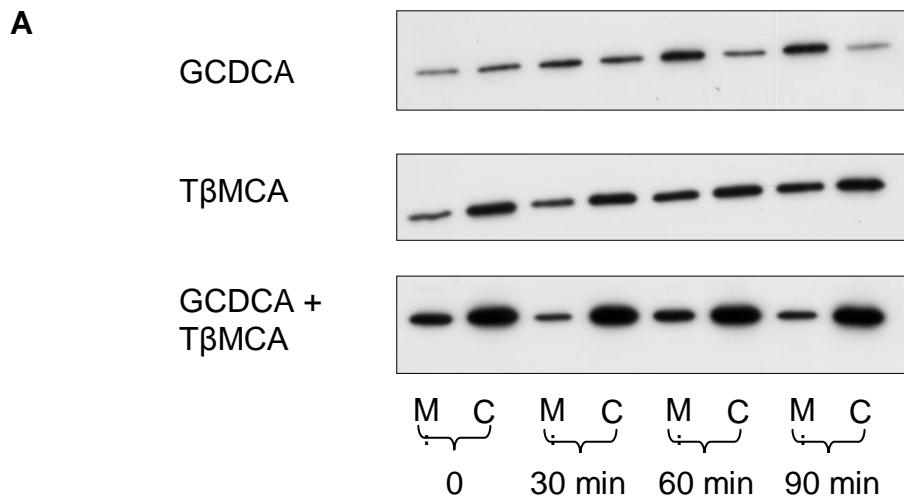


Abbildung 12 Tauro- β -Muricholsäure verhindert die mitochondriale Translokation des pro-apoptotischen Bcl-2 Proteins Bax. HepG2 Zellen wurden mit GCDCA und T β MCA (25 μ mol/L) für 0, 30, 60 und 90 Minuten inkubiert. Die mitochondriale und zytosolischen Bestandteile wurden mittels Zentrifugation getrennt. GCDCA führt

zu einer Erhöhung des mitochondrialen Anteils von Bax. (A,B). Die hydrophile T β MCA hat hingegen keinen Effekt auf die mitochondriale Translokation (C). Vielmehr kann sie die GCDCA-induzierte Translokation verhindern (A). n=5-11. *p<0,05 vs. unbehandelte Zellen. **p<0,01 vs. unbehandelte Zellen. Einen repräsentativen Western Blot zeigt (A). M Mitochondriale Fraktion, c zytosolische Fraktion.

4.2 Reaktionen verschiedener Spezies auf hydrophile und hydrophobe Gallensäuren

Die unterschiedlichen Spezies, wie Ratte, Maus, Hamster oder Mensch, reagieren unterschiedlich auf Gallensäuren bezüglich der apoptotischen Eigenschaften oder auch ihrer Gallensäureaufnahme. Wie schon unter 4.1 demonstriert werden bei Nagern höhere Konzentrationen hydrophober Gallensäuren benötigt, um ähnliche Apoptoseraten wie in einer humanen Hepatomzelllinie zu erreichen.

4.2.1 Ausmaß der Zellschäden in verschiedenen Spezies bei Gallensäuren-induzierter Apoptose

4.2.1.1 Primäre Rattenhepatozyten

Die Caspase 3/7-Aktivität kann bei primären Rattenhepatozyten durch hydrophobe Gallensäuren wie GCDCA dosisabhängig ausgelöst und nachgewiesen werden. Weiterhin werden durch die hydrophile TUDCA protektive Effekte erreicht und der ausgelöste Schaden signifikant vermindert. Auch in diesen Versuchen wird demonstriert, dass hydrophile Gallensäure alleine keine signifikanten Zellschäden auslösen. Bei den primären Rattenhepatozyten kann wiederum die Eigenschaft beobachtet werden, dass relativ hohe Konzentrationen hydrophober und toxischer Gallensäuren notwendig sind, um Apoptose auszulösen. Diese wurde schon unter 4.1.1. beschrieben und ist mit dem Vorhandensein von Muricholsäure im natürlichen Gallepool der Nager zu erklären.

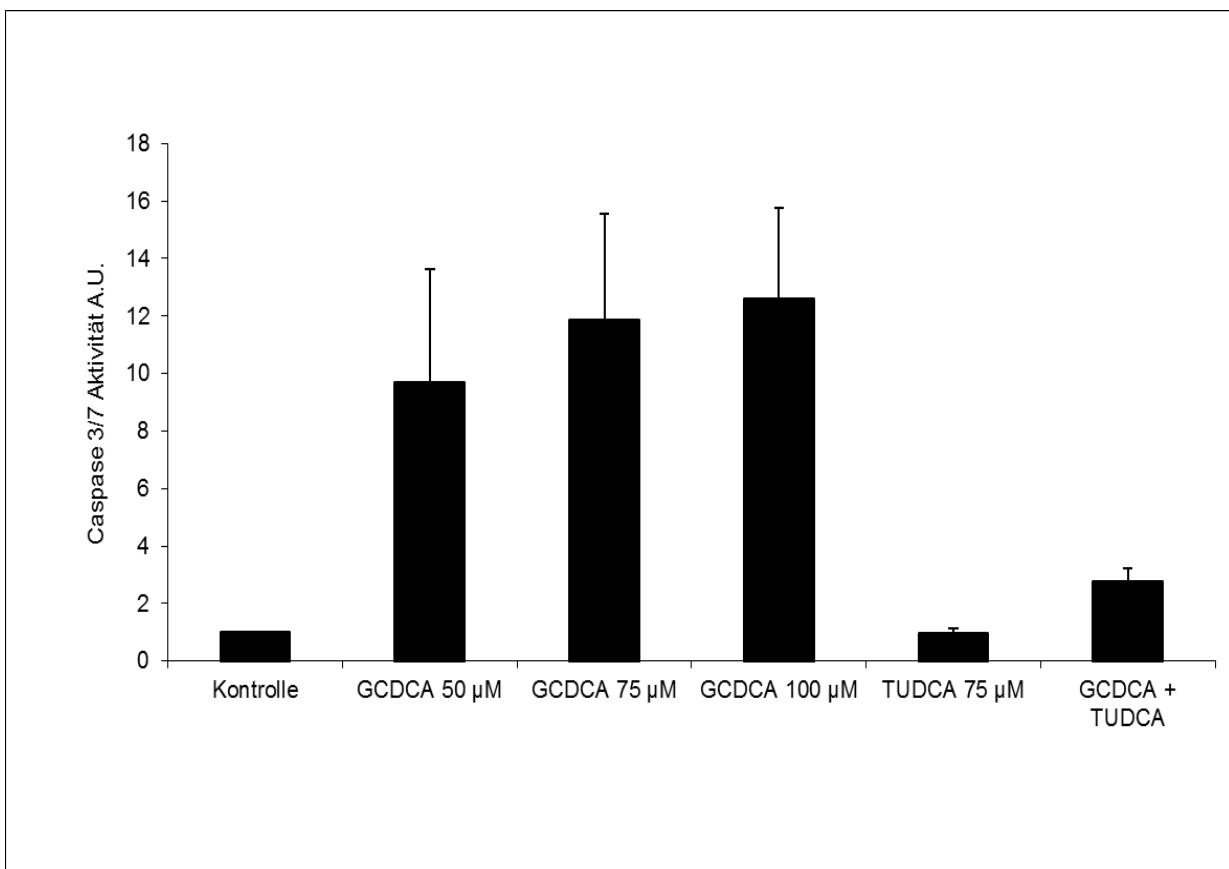


Abbildung 13 Dosisabhängige Glycochenodeoxycholsäure-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten. GCDCA kann in den steigenden Konzentrationen 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$ dosisabhängig Apoptose induzieren. Eine gleichzeitige Inkubation mit der hydrophilen Taurooursodeoxycholsäure verhindert diese. Eine statistische Signifikanz kann aufgrund von $n=3$ nicht erreicht werden. Jedoch ist ein klarer Trend zu erkennen, dass TUDCA Apoptose verhindert. Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Aktivität gemessen ($n=3$).

4.2.1.2 Primäre Maushepatozyten

Auch in primären Hepatozyten der Maus kann gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen der Glycochenodeoxycholsäure benötigt werden, um Apoptose auszulösen. Eine verlängerte Kulturzeit zeigt dabei keinen Einfluss auf diesen Effekt.

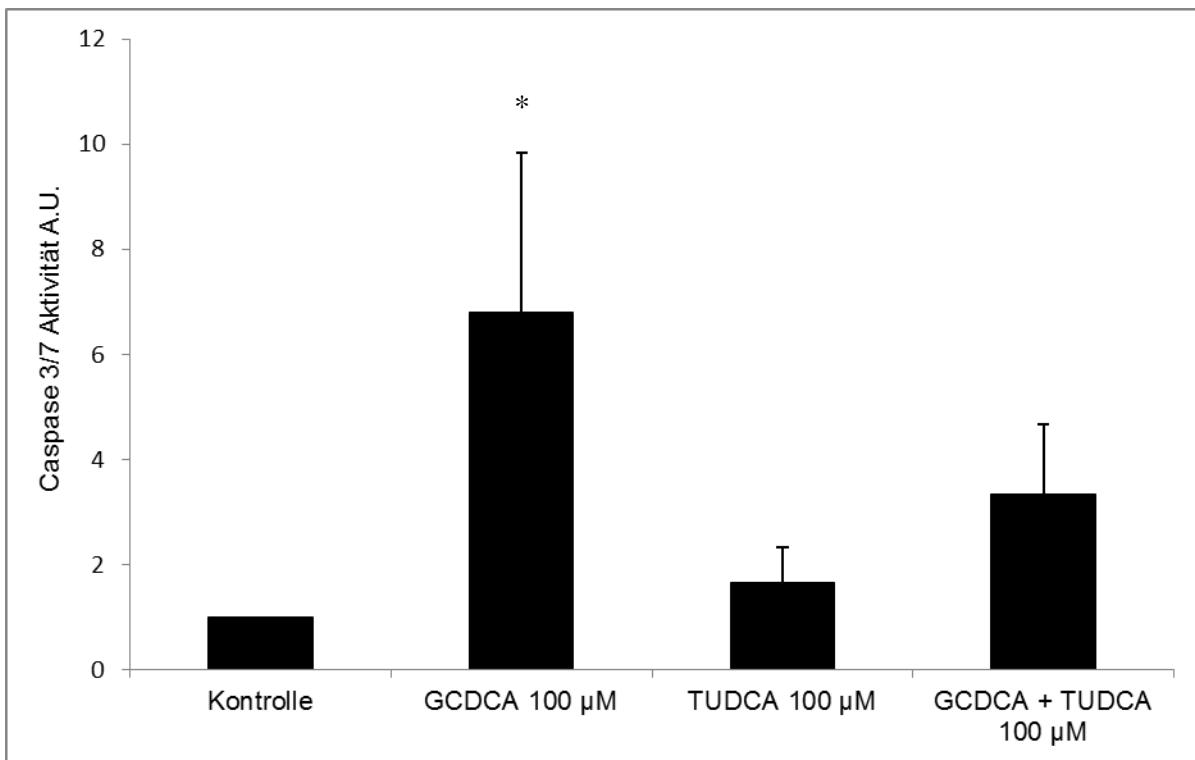


Abbildung 14 Glycochenodeoxycholsäure-induzierte Apoptose in primären Maushepatozyten. GCDCA induziert in primären Maushepatozyten in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ signifikant Apoptose. * $p<0,05$ vs. Kontrolle. Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Aktivität gemessen (n=5).

4.2.1.3 Primäre Hamsterhepatozyten

Primäre Hamsterhepatozyten hingegen ähneln in Reaktion auf hydrophobe Gallensäuren eher den menschlichen HepG2-Zellen. Auch geringe Konzentrationen der Glycochenodeoxycholsäure reichen aus, um signifikant einen Zellschaden auszulösen. Hydrophile Gallensäuren wie die Taurooursodeoxycholsäure sind auch hier in der Lage den Zellschaden signifikant zu reduzieren.

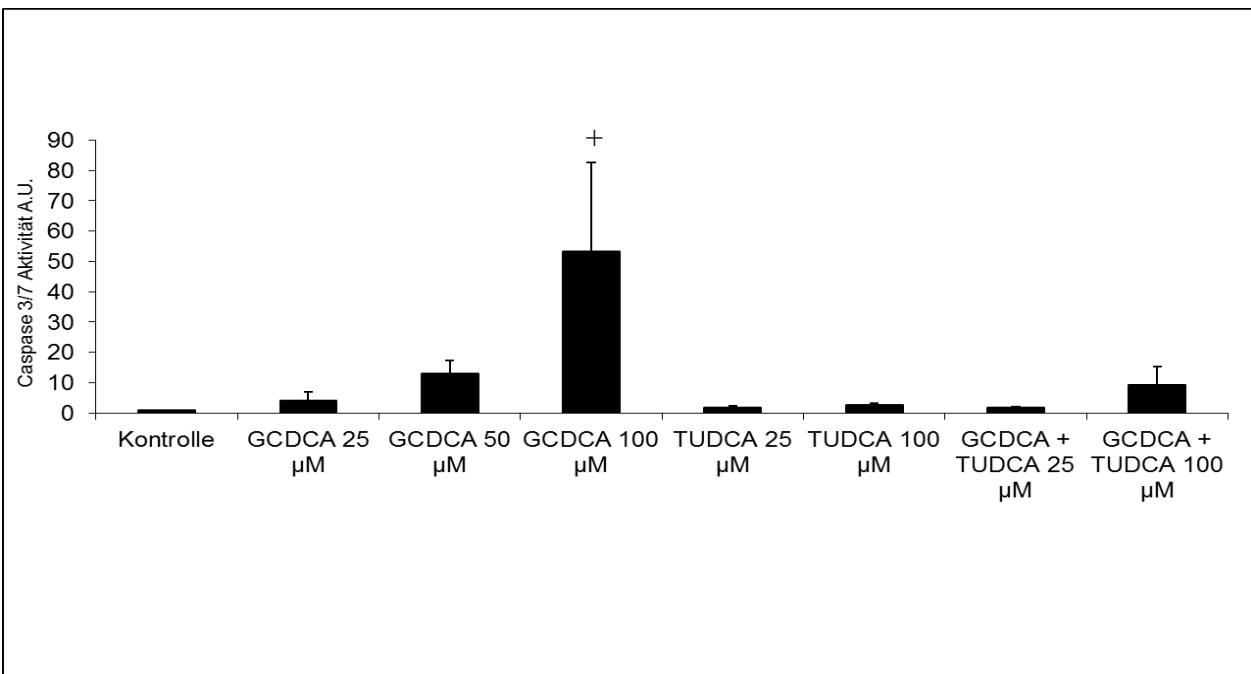
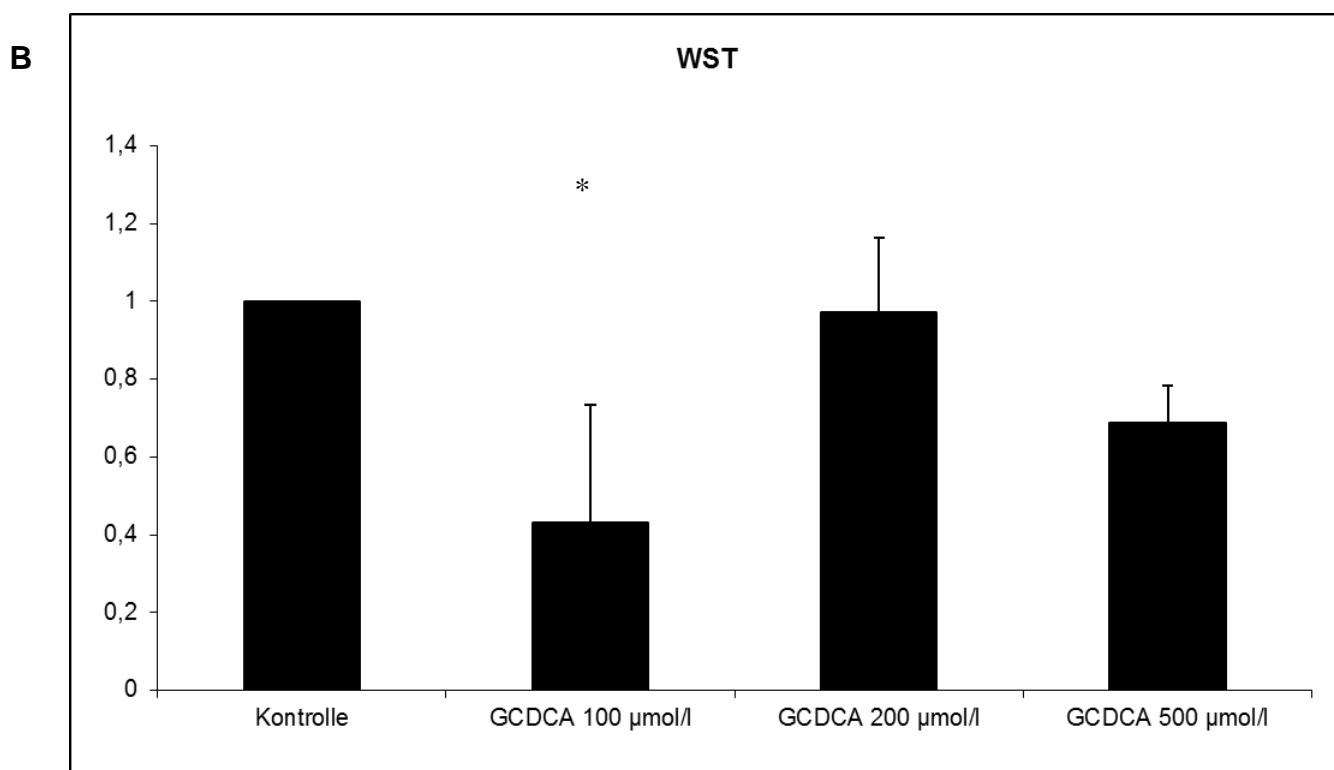
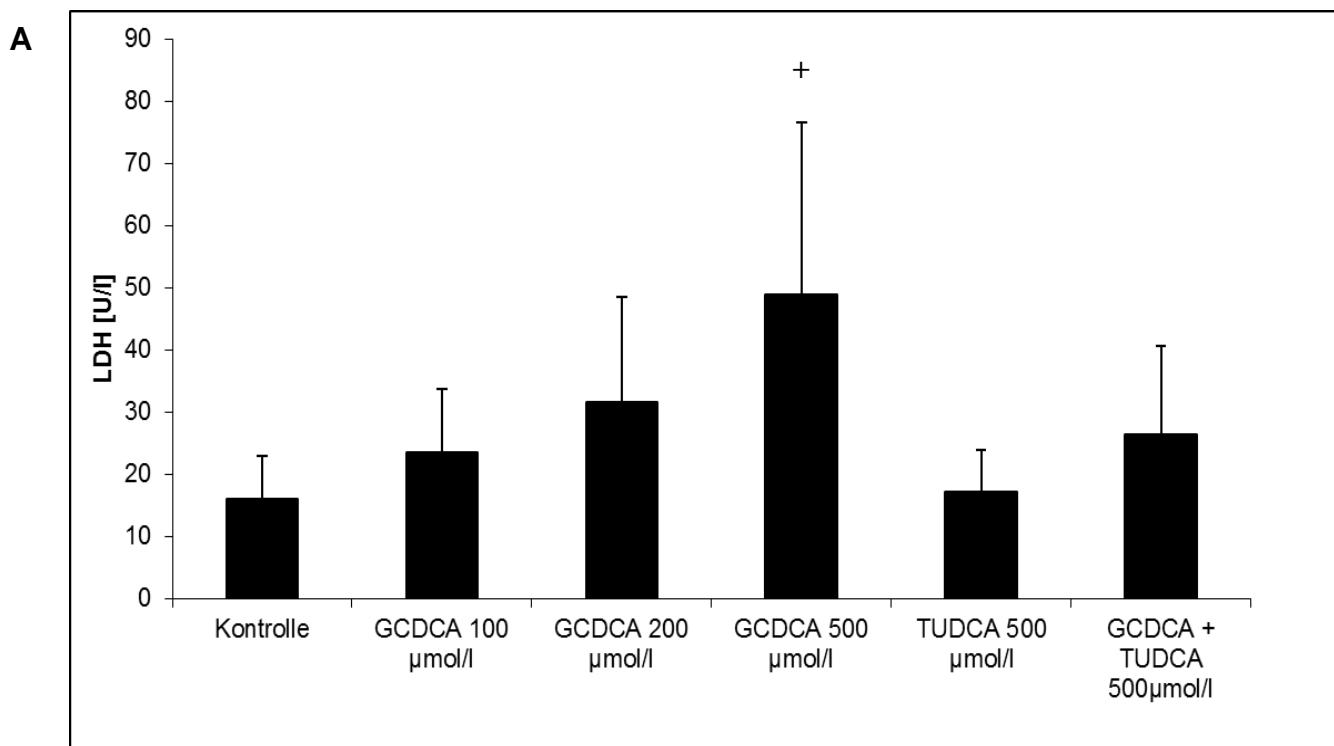


Abbildung 15 Glycochenodeoxycholsäure-induzierte Apoptose in primären Hamsterhepatozyten. GCDCA induziert in primären Hamsterhepatozyten in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ signifikant Apoptose. $+p<0,01$ vs. Kontrolle und TUDCA. Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Aktivität gemessen ($n=4$).

4.2.1.4 Primäre humane Hepatozyten

In der Literatur sind Daten zu primären humanen Hepatozyten bezüglich Gallensäuren-induzierter Apoptose selten zu finden. Interessanterweise sind auch hohe Konzentrationen (100, 200, 500 $\mu\text{mol/L}$) nicht ausreichend, um eine signifikante Apoptose zu erreichen. In der Positivkontrolle mittels Anti-Apo-1 und Tnf α +Actinomycin D gelingt der Beweis, dass die Hepatozyten prinzipiell in der Lage sind, in den apoptotischen Zelltod zu gehen.

Ein Zellschaden hingegen ist durch hydrophobe Gallensäuren zu erreichen. Zum einen wird die LDH-Ausschüttung in das Zellmedium gesteigert und zeigt damit einen Zelluntergang an. Zum anderen konnte in einem WST-Vitalitätsassay demonstriert werden, dass Glycochenodeoxycholsäure die Zellvitalität signifikant reduziert.



C

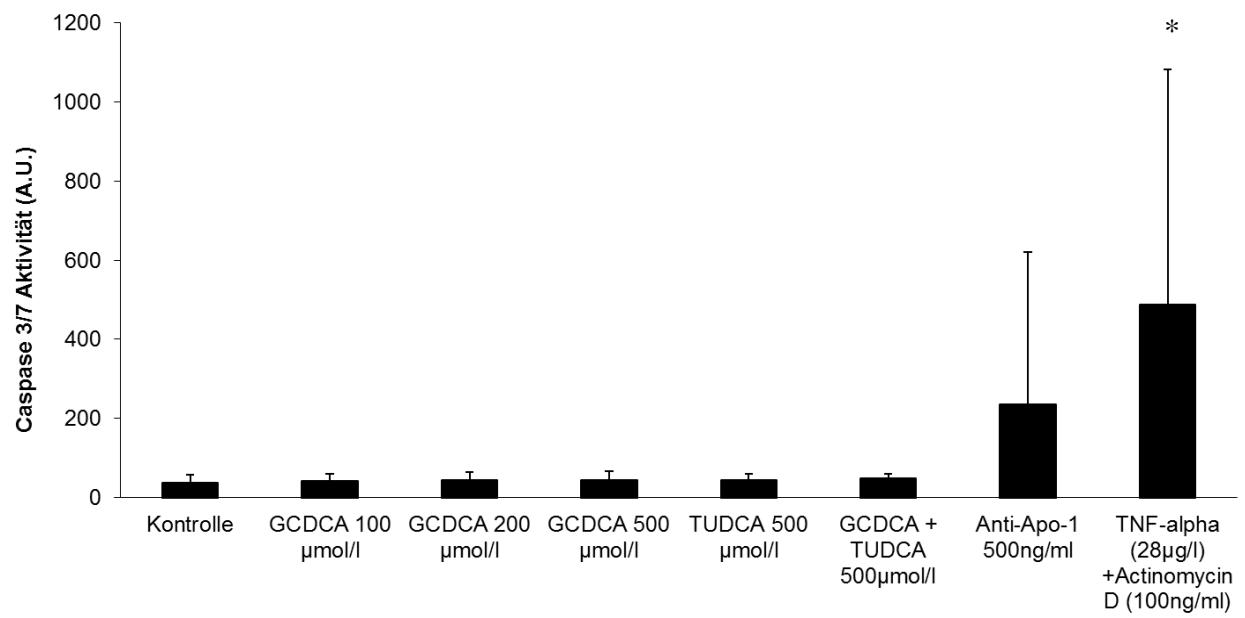


Abbildung 16 Zellschädigung durch hydrophobe Gallensäuren in humanen Hepatozyten. In primären humanen Hepatozyten führt die Inkubation mit hohen Konzentrationen hydrophober Gallensäuren (100, 200, 500 $\mu\text{mol/L}$) zu keiner relevanten Caspase 3/7 Aktivität und damit zu keiner Apoptose (C). Prinzipiell sind die Hepatozyten in der Lage in Apoptose zu gehen (Anti-Apo-1, TNF α +Actinomycin (C)). Ein signifikanter Zellschaden kann mittels der LDH Ausschüttung in Zellmedium (A) und einem WST Vitalitätsassay (B) detektiert werden ($n=3-6$). +p<0,05 vs. Kontrolle vs. TUDCA. *p<0,05 vs. Kontrolle.

4.2.2 Nekroptose als möglicher Schädigungsmechanismus

Unter 4.2.1.4 konnte demonstriert werden, dass primäre humane Hepatozyten keine relevante Apoptoseaktivität nach Inkubation mit hydrophoben, toxischen Gallensäuren aufweisen. Es gelingt allerdings einen Zellschaden mittels LDH im Zellüberstand und durch einen WST Vitalitätsassay nachzuweisen. Es bleibt daher zu klären, welcher Schädigungsmechanismus (Nekrose oder Apoptose) für den Zelluntergang in humanen Hepatozyten verantwortlich ist. Wir können in Abbildung 16 einen alternativen Schädigungsweg aufweisen. Nach Inkubation von humanen Hepatozyten mit TNF α kommt es zu einer signifikanten Caspase 3/7 Aktivität. Diese wiederum kann durch den Pan-Caspaseinhibitor zVED geblockt werden. Auch die LDH im Zellüberstand als Marker für Zellschäden wird durch TNF α erhöht. Wird nun durch Zugabe von Necrostatin-1 (Nec-1) der nekroptotische Signalweg blockiert, kommt es zu einer signifikanten Reduktion des Zellschadens.

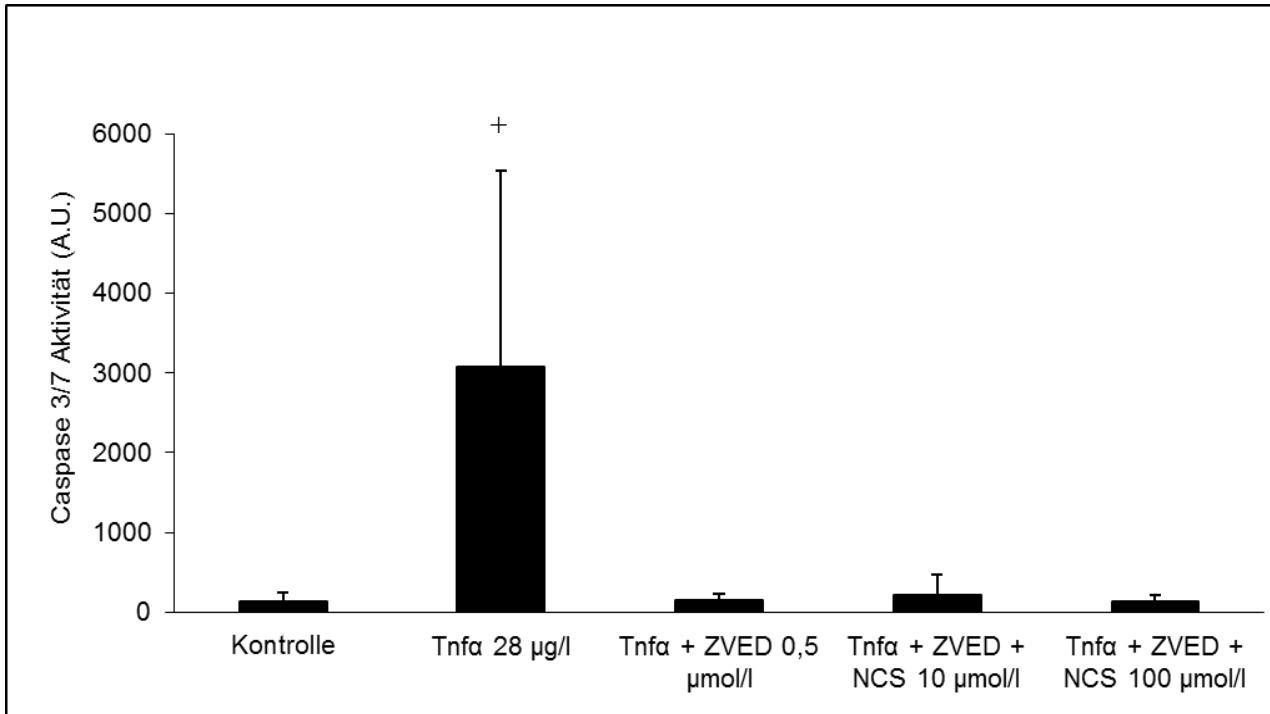
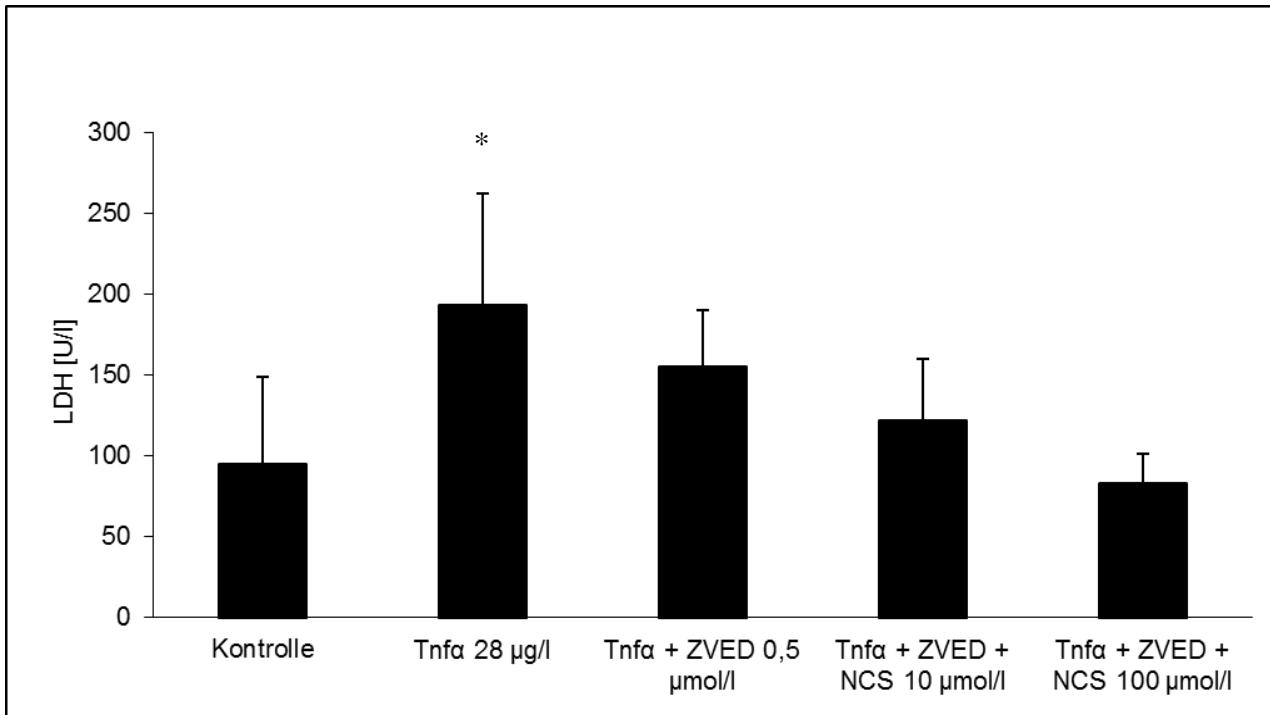
A**B**

Abbildung 17 Nekrose als möglicher Schädigungsmechanismus in primären humanen Hepatozyten.

Durch TNF α +Actinomycin D kann in primären humanen Hepatozyten signifikant eine Caspase 3/7 Aktivität ausgelöst werden (A). Durch den panCaspase-Inhibitor ZVED kann dieser Effekt blockiert werden. Ebenfalls

kommt es durch TNF α +Actinomycin D zu einer signifikanten LDH Ausschüttung in das Zellmedium. Durch Necrostatin 1, einem spezifischer Inhibitor der Nekroptose, kommt es zu einer Reduktion der LDH (B). n=6. +p<0,01 vs. alle Varianten. *p<0,01 vs. Kontrolle vs. Tnfa+zVED+NCS.

5 Diskussion

5.1 Protektive Eigenschaften der β -Muricholsäure bei hepatozellulärer Apoptose

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der β -Muricholsäure und deren anti-apoptotischen Eigenschaften. Hydrophobe Gallensäuren schädigen Hepatozyten nachgewiesenermaßen und spielen bei der irreversiblen Leberschädigung bei Cholestase eine entscheidende Rolle.⁹⁶ Als Ursache für die Zellschädigung wird ein Ungleichgewicht zwischen den toxischen, hydrophoben und den protektiven, hydrophilen Gallensäuren innerhalb der Hepatozyten angenommen. Dadurch kommt es zu einem Verlust der Fähigkeit von Leberzellen, potentiell toxische Substanzen nach außen zu transportieren, die dann wiederum intrazellulär akkumulieren. Die Chenodeoxycholsäure (CDCA) und ihre Glycin- und Taurin-konjugierten Derivate spielen dabei quantitativ die dominierende Rolle und sind damit hauptverantwortlich für die cholestatichen Zellschäden.^{139,140}

Die Art der Zellschädigung, die durch Gallensäuren hervorgerufen wird, differiert dabei zwischen Apoptose und Nekrose, wobei bei niedrigeren Konzentrationen toxischer Gallensäuren Apoptose und bei hohen die Nekrose eine entscheidende Rolle spielt.¹⁴¹⁻¹⁴³ Der genaue Mechanismus, wie es zu diesem Zelluntergang kommt, wird aktuell diskutiert. Postuliert werden zum einen mitochondrial vermittelte Schäden, aber auch Gewebestress und damit verbundene inflammatorische Prozesse scheinen wichtige Rollen zu spielen.^{73,144,145}

Eine weitere mögliche Form der Zellschädigung scheint die sogenannte Nekroptose zu sein. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sie Caspasen-unabhängig, allerdings durch Todesrezeptoren kontrolliert abläuft.⁷⁷ Da in den von uns durchgeführten Versuchen die Nekroptose bei primären Rattenhepatozyten vorzukommen scheint, könnte dies auch ein möglicher Schädigungsmechanismus in menschlichen Leberzellen sein. Dafür spricht weiterhin die Beobachtung, dass in primären humanen Hepatozyten auch hohe Konzentrationen von hydrophoben Gallensäuren keine signifikante Apoptose auslösen können, es aber zu einem Anstieg der LDH im Medium kommt. Dieser LDH Anstieg konnte bei Ratten durch gleichzeitige Inkubation mit dem spezifischen RIP 1- Inhibitor Necrostatin verhindert werden.

5.1.1 Tauro-β-Muricholsäure verhindert hepatozelluläre Apoptose durch eine Stabilisierung des Mitochondrialen Membranpotentials

In der vorliegenden Arbeit konnten wir anhand von Zellmodellen verschiedener Spezies (Mensch, Maus und Ratte) zeigen, dass die T β MCA der hepatozellulären Apoptose entscheidend entgegenwirkt und zytoprotektive Eigenschaften aufweist. Bei den primären Hepatozyten von Maus und Ratte wurden bis zu 4-fach höhere Konzentrationen der hydrophoben GCDCA benötigt, um ähnliche apoptotische Zellschäden zu erzielen wie in der humanen Hepatomzelllinie Ntcp-HepG2. Dies weist daraufhin, dass die Nager wesentlich resistenter gegenüber Zellschäden sind, die durch Gallensäuren verursacht werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Tatsache liefern, dass die β MCA natürlicherweise bei Maus und Ratte in der Leber vorkommt und damit diesen vermehrt protektive Eigenschaften verleiht.⁶⁰ Beim Menschen ist diese Gallensäure dagegen nicht nachweisbar. Im menschlichen Organismus wird β MCA bei Zufuhr von außen zu einem Großteil mit Glycin und in geringerer Menge auch mit Taurin konjugiert, durchläuft dann einen enterohepatischen Kreislauf und wird schließlich über den Fäzes und den Urin ausgeschieden.⁶¹ Im Gegensatz zur TUDCA wird die T β MCA im Intestinum nicht in die hydrophobe und toxische Lithocholsäure umgewandelt und hat damit potentiell geringere inflammatorische Nebenwirkungen.

Dies liegt darin begründet, dass die T β MCA zusätzlich eine 6 β -Hydroxylgruppe besitzt und damit einer Metabolisierung durch die 7-Dehydroxylase im menschlichen Organismus nicht zugänglich ist.⁶¹ Zusammengefasst ergeben sich dadurch Vorteile der β MCA gegenüber dem Einsatz von UDCA, da erstere zum einen wesentlich hydrophiler ist und zum anderen nicht in eine toxische Gallensäure umgewandelt werden kann und damit weniger schädlich ist.

Da wir zusätzlich für die β MCA einen positiven Einfluss bei hepatozellulärer Apoptose nachweisen konnten, könnte das ein neuer interessanter Therapieansatz bei cholestaticischen Erkrankungen sein. Ob dies als Monotherapie oder in Kombination mit der bewährten UDCA durchzuführen wäre, sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein, die die β MCA auch *in vivo* testen. In vielen älteren Studien konnten der T β MCA schon in anderweitigen experimentellen Cholestasemodellen oder auch bei nekrotischen Leberzellschäden protektive Eigenschaften bescheinigt werden. In unserer Arbeit konnten zum ersten Mal die Vorzüge der T β MCA speziell bei Gallensäuren-induzierter Apoptose herausgestellt werden.

In einer Arbeit von Milkiewicz et al. von 2002 wurde gezeigt, dass die T β MCA bei Taurolithocholsäure-induzierter Cholestase in primären Rattenhepatozyten protektiv über die Aktivierung von PKC und einer Ca²⁺ Mobilisierung wirkt.⁶⁴ Katagiri et al. konnten schon 1992 demonstrieren, dass in einem Taurocholsäure (TCA)-induzierten Cholestasemodell bei Colchicin behandelten Ratten, die perfundiert wurden, ähnliche Effekte vorkamen. Die T β MCA wirkte in diesem Modell choleretisch, stimulierte den Gallefluss und konnte so der durch TCA in Kombination mit Colchizin, welches zu mikrotubuläre Störungen führte, ausgelösten Cholestase entgegenwirken.⁶⁵

Zudem führte die T β MCA in den nicht mit Colchicin vorbehandelten Rattenlebern zu einer Erhöhung der biliären HCO₃⁻ Konzentration.⁶⁵ Diese Tatsache ist deshalb von so entscheidender Bedeutung, da jüngst gezeigt werden konnte, dass ein Bikarbonatschirm einen wichtigen schützenden Mechanismus bei Gallensäuren-induzierten Zellschäden in humanen Cholangiozyten darstellt.¹⁴⁶ Ein Defekt in diesem Mechanismus könnte deshalb zu schweren chronischen Cholangiopathien führen. Spekulativ könnte deshalb die Behandlung mit β MCA einen Vorteil bei diesen Krankheitsbildern bringen.

Weitere Studien belegen in unterschiedlichen Designs die Wirksamkeit der β MCA. So konnte in einem weiteren Perfusionsmodell an der Ratte, die 1 h mit der hydrophoben Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) perfundiert wurden, eine LDH-Ausschüttung als Zeichen des Zellschadens durch T β MCA signifikant reduziert werden. In einem Zellmodell mit primären Rattenhepatozyten konnte dieser Effekt in ähnlicher Weise wiederholt werden.^{147,148}

Dabei wurden die primären Zellen mit TCDCA in einer sehr hohen Konzentration von 1 mmol/l inkubiert. Daraufhin kam es zu einem deutlichen Anstieg der LDH-Konzentration im Überstand des Mediums, was den massiven Zellschaden anzeigen. Eine gleichzeitige Inkubation mit T β MCA reduzierte diesen Zelluntergang signifikant und führte gleichzeitig dazu, dass über einen gesteigerten Galleefflux der intrazelluläre Gehalt an TCDCA abnahm und so die Toxizität weiter abgemildert werden konnte.¹⁴⁸

Aufgrund dieser teilweise älteren Daten und den aktuellen Erkenntnissen durch die vorliegende Arbeit, könnte die hydrophile Gallensäure T β MCA potenziell nützlich in der Therapie cholestaticischer Erkrankungen sein.

Die genauen Mechanismen, durch die diese anti-apoptotischen Eigenschaften vermittelt werden, sind nicht bekannt. Bei der hepatzellulären Apoptose sind verschiedene Ansätze bekannt, die letztendlich den Zelluntergang bewirken; u.a. spielen die Mitochondrien und damit das mitochondriale Membranpotential (MMP) eine wichtige Rolle.¹⁴⁹ Zudem konnten in den letzten Jahren die Wirkungsmechanismen der UDCA genauer ergründet werden.¹⁴³ Die Mitochondrien sind dabei wichtige Angriffspunkte, so dass wir bei der Suche nach den molekularen Mechanismen der T β MCA vor allem diese untersuchten.

Wir konnten zeigen, dass T β MCA das MMP stabilisiert. Zu einem Zusammenbruch des MMP führte die Inkubation von Ntcp-HepG2-Zellen mit GCDCA in verschiedenen Konzentrationen, wobei die T β MCA dies signifikant an verschiedenen Zeitpunkten verhindern konnte. Somit stellt dies einen möglichen Ansatzpunkt dar, durch den β MCA schützend wirkt. Weiterhin konnte die durch GCDCA ausgelöste Translokation des pro-apoptotischen Bcl-2 Proteins Bax vom Zytosol zu den Mitochondrien verhindert werden. Da Bax eine wesentliche Rolle bei der Induktion des sog. „mitochondrial permeability transition“ (MPT) und der damit verbundenen Cytochrom-Freisetzung spielt, ermöglicht die Blockade dieser Translokation Gallensäure-induzierte Apoptose zu verhindern.^{125,150}

Prinzipiell ist bekannt, dass Gallensäuren direkt die MPT, die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch die Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren. Auf diese Weise wird direkt Apoptose in Leberzellen ausgelöst.^{125,145} Aufgrund dieser Erkenntnisse sind die Mitochondrien womöglich eine der wichtigsten Angriffspunkte, durch die die β MCA-Zellschäden, die durch hydrophobe Gallensäuren verursacht werden, abwendet.

5.1.2 T β MCA verhindert Palmitat-induzierte Apoptose

Die Steatose ist das charakteristische Merkmal der „Non Alcoholic Fatty Liver Diseases“ (NAFLD). Begleitend sind oft eine Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie. In einigen Fällen kann sie reversibel sein und führt damit zu keiner Beeinträchtigung der Organfunktion. In anderen Fällen schreitet sie fort und die Patienten entwickeln eine Steatohepatitis (NASH, non-alcoholic steatohepatitis), die später zu Fibrose und Zirrhose führt.^{151,152}

Bei NASH-Patienten kommt es vermehrt zu frei zirkulierenden Fettsäuren und deren Serumspiegel korrelieren mit dem Schweregrad der Steatohepatitis. Verschiedene freie Fettsäuren sind in hohen Konzentrationen potente zelluläre Toxine und induzieren Lipoapoptose.¹⁵³ Es ist zudem bekannt, dass die freie Fettsäure Palmitat Lipoapoptose durch einen JNK-abhängigen Mechanismus in Hepatozyten auslösen kann. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Bax, was wiederum über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg zur Apoptose führt.¹⁵⁴

In unserer Arbeit zeigte sich eine Veränderung des MMP und damit Zellschäden bei HepG Zellen, die mit Palmitat behandelt wurden. Auch in diesem Fall bewirkte die simultane Inkubation mit T β MCA, dass das MMP stabilisiert wurde und so der Zellschaden und eine damit verbundene Apoptose verhindert wurden. Somit ergeben sich für die β MCA nicht nur protektive Eigenschaften bei der durch Gallensäuren induzierten Apoptose, sondern auch in einem anderen Modell der Leberzellschädigung, nämlich die durch die freie Fettsäure Palmitat.

5.1.3 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die β MCA wirksame anti-apoptotische Eigenschaften besitzt.

Bei unseren Versuchen konnte die durch GCDCA ausgelöste Apoptose durch T β MCA in einer humanen Hepatomzelllinie, aber auch in primären Hepatozyten von Maus und Ratte effektiv verhindert werden. Es zeigte sich außerdem, dass Nager durch die dort natürlich vorkommende β MCA resistenter gegenüber den toxischen Gallensäuren sind. Zudem konnte als möglicher Wirkmechanismus eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) identifiziert werden. Ebenfalls auf mitochondrialer Ebene wurde eine Translokation des pro-apoptotischen Bax Proteins durch T β MCA verhindert. Auch die Zellschädigung durch die freie Fettsäure Palmitat konnte durch T β MCA über eine Stabilisierung des MMPs reduziert werden.

Perspektivisch könnten sich für die β MCA daher Einsatzmöglichkeiten bei der Verhinderung bzw. Verbesserung cholestatischer Erkrankungen ergeben.

5.2 Gallensäuren-induzierte Apoptose in verschiedenen Spezies

Wie schon weiter oben erwähnt, spielt die Akkumulation toxischer Gallensäuren in der Leber eine entscheidende Rolle bei cholestatischen Lebererkrankungen.¹⁵⁵ Dies führt dann durch Induktion hepatozellulärer Apoptose zu einer progredienten Leberschädigung. Die GCDCA ist dabei die dominierende Gallensäure und führt nach Aufnahme in die Hepatozyten effektiv zur Apoptose.³⁸

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit den verschiedenen Spezies Mensch, Maus, Ratte und Hamster hinsichtlich eventueller Unterschiede bei der durch Gallensäuren induzierten Apoptose beschäftigt.

Primäre Hepatozyten von Ratte und Maus sind ein oft verwendetes Zellmodell und es existieren Studien, die belegen, dass durch hydrophobe Gallensäuren Zellschäden verursacht werden.^{75,84} Auch die protektiven Eigenschaften der UDCA sind durch Arbeiten an primären Zellen bewiesen.¹⁴² Es existieren allerdings keine suffizienten Studien, die verschiedene Spezies miteinander vergleichen.

Zudem fehlt es an Studien, die die verschiedenen Spezies auf deren mögliche Unterschiede bei der Gallensäureaufnahme über mehrere Tage zeigt. Dieser Faktor ist wichtig in der Zellkultur und der Verwendung primärer Zellen für z.B. Gallensäure-induzierte Apoptose, da die Zellen über die Zeit ihre Transportfähigkeit einbüßen.

Zu den primären Hepatozyten des Hamsters finden sich Studien, die zeigen konnten, dass es *in vivo* durch CDCA zu Leberschäden kommt, die auch durch UDCA verhindert werden konnten. Ein Vorteil des Hamsters gegenüber anderen Nagern ist die Tatsache, dass die Zusammensetzung der Galle sehr dem Menschen ähnelt. Zusätzlich ist beim Hamster die β MCA wie bei Maus und Ratte vorhanden.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Primäre humane Hepatozyten sind nur schwer standardisiert zu kultivieren, da deren Verfügbarkeit deutlichen Schwankungen unterliegen kann. Weiterhin können sich die Zellen unterschiedlicher Spender hinsichtlich ihrer Vitalität, Gallensäureaufnahmekapazität und ihrer Apoptosefähigkeit deutlich unterscheiden. Insgesamt existieren nur sehr wenige Studien, die primäre humane Zellen verwendet haben. Zusätzlich sind humane Hepatomzelllinien eine anerkannte und gut reproduzierbare Alternative gegenüber primären Hepatozyten. Eine der bekanntesten Hepatomzelllinien sind die auch von uns verwendeten HepG2-Zellen. Neuere vielversprechende Zelllinien sind z.B. die HepaRG Zellen. Diese wurden 2002 erstmalig beschrieben und sind ursprünglich von weiblichen Patientin mit Leberzirrhose aufgrund einer Hepatitis C

isoliert und kultiviert worden.¹⁵⁹ Von diesen existieren derzeit zwei morphologisch unterschiedliche Populationen: die hepatozyten-ähnlichen und die biliar-epithelial-ähnlichen Zellen.^{160,161} Mehrfach und in vielen Studien belegt ist deren hohe Expression xenobiotischer Enzyme, vergleichbar mit denen humaner Hepatozyten, die die HepaRG-Zellen für Medikamentenstudien sehr interessant machen.¹⁶¹⁻¹⁶³ Welche Eigenschaften diese Zelllinie in Bezug auf Gallensäure-induzierten Zellschaden besitzt, ist derzeit noch unklar. Sie könnten allerdings potenziell in cholestaticischen Modellen als Alternative für humane Hepatozyten dienen.

Eine Studie von Hillaire et al. aus dem Jahr 1995 zeigte, dass die CDCA Zellschäden verursacht. Diese wurden anhand einer vermehrten LDH-Freisetzung und einer verminderten Albuminsekretion der kultivierten Hepatozyten festgestellt.¹⁶⁴ Eine weitere Arbeit von Benz et al. zeigte anhand eines ELISA DNA Fragmentationsassays und eines TUNEL-Assays, dass womöglich die Apoptose auch eine wichtige Rolle einnimmt.¹⁶⁵

5.2.1 Unterschiede bei der Caspase-Aktivität

Wir konnten an den primären Hepatozyten zeigen, dass mit Ausnahme der humanen alle Spezies in der Lage sind, durch hydrophobe Gallensäuren in Apoptose zu gehen. Die bisherigen Erkenntnisse in der Literatur konnten wir durch diese Ergebnisse bestätigen und erweitern.

Interessant war vor allem die Tatsache, dass die humanen Hepatozyten durch GCDCA keine Caspase-Aktivität aufzeigten. Allerdings wurde ein Zellschaden durch GCDCA signifikant, der durch die LDH im Medium und einen Vitalitätsassay nachgewiesen werden konnte. Wir sind davon ausgegangen, dass weitere Schädigungsmechanismen existieren, die dieses Phänomen erklären können. Im Folgenden wird daher genauer auf die Nekroptose eingegangen, die möglicherweise eine entscheidende Rolle spielt, da diese Todesrezeptoren-abhängig, aber ohne die Beteiligung von Caspasen vonstatten geht.

5.2.2 Die Nekroptose in primären Rattenhepatozyten

Interessanterweise zeigten die humanen Hepatozyten in unseren Versuchen keine signifikante Apoptose im Sinne einer erhöhten Caspase 3/7-Aktivität. Die Apoptose spielt eine zentrale Rolle bei der Gallensäure-induzierten Zellschädigung.¹⁶⁶ Aktuell wird angenommen, dass geringe Konzentrationen hydrophober Gallensäuren eher zu Apoptose führen und bei höheren Konzentrationen wiederum die Nekrose entscheidend beteiligt ist.^{75,125}

Die Apoptose galt lange Zeit als alleinige Form des sogenannten programmierten Zelltodes, der ohne Inflammation geregelt abläuft, während die Nekrose als ungeregelt und unkontrollierbar erachtet wurde.⁷⁷ Degterev et al. postulierten 2005, dass es auch eine Form der programmierten Nekrose gibt, welche als Nekroptose bezeichnet wird.¹⁶⁷

Eingeleitet wird diese programmierte Nekrose über Todesrezeptoren wie z.B. TNFR 1 („tumour necrosis factor receptor 1). Eine wichtige Rolle nimmt weiterhin die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität des RIP1 („receptor-interacting protein 1“) ein. Diese Kinase kann spezifisch über sogenannte Necrostatine geblockt werden und so die Einleitung der Nekroptose verhindert werden.^{168,169}

Eigentlich kommt es über die Stimulation der Fas/TNF-Rezeptorfamilie zur Einleitung des extrinsischen apoptotischen Signalweges. In Studien konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit dieser apoptotischen Stimuli, durch die Aktivierung von Todesrezeptoren oben genannter nicht-apoptotischer Todesweg eingeschlagen wird.^{167,170,171} Folglich kann man festhalten, dass die Nekroptose über die gleichen Rezeptoren aktiviert wird wie die Apoptose, es sich also um einen geregelten Prozess handelt. Unterschiede zeigen sich insofern, dass wichtige apoptotische Regulatoren wie Caspasen, Bcl-2 Proteine oder auch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, bei der Nekroptose keine Rolle spielen.⁷⁷

In der Literatur wurden verschiedene Möglichkeiten zur Detektion der Nekroptose beschrieben. Zum einen besteht die Möglichkeit über TNF α gezielt die Todesrezeptoren zu aktivieren und gleichzeitig mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD.fmk den apoptotischen Signalweg auszuschalten. Eine gleichzeitige Inkubation mit dem spezifischen RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 (Nec-1) blockiert nun die Nekroptose, so dass beide Todeswege verhindert werden und der Zellschaden heruntergesetzt wird. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, über siRNA-Konstrukte

gezielt einen Knockdown der RIP 1-Kinase zu erzielen, um so die Nekroptose zu verhindern. Als „read out“ dienen die Messung der LDH im Zellmedium nach Inkubation oder auch die Durchführung eines Vitalitätsassay, da für diese Form des Zelluntergangs die gleichen morphologischen Charakteristika gelten wie für die Nekrose.^{77,78,170,172}

In unserem Fall konnten wir erstmals an primären Rattenhepatozyten nachweisen, dass die Nekroptose möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Leberzellenschädigung spielt. Bisher wurde der Nekroptose vor allem bei anderen pathologischen Ereignissen eine Beteiligung zugesprochen. Als Beispiel sei die neuronale Excitotoxizität erwähnt, die mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson assoziiert ist. So konnten protektive Eigenschaften des RIP 1-Inhibitors Nec-1 in hippocampalen HT-22 Zellen oder auch in Neuronen von Ratten nachgewiesen werden. Weiterhin verkleinert Nec-1 die Infarktgröße bei Verschlüssen der A. cerebri media in einem Schlaganfallmodell an der Maus.^{78,173-175}

In unseren Versuchen zeigte sich bei der Inkubation primärer humaner Hepatozyten mit hydrophoben Gallensäuren wie GCDCA oder TLCA keine Caspase-Aktivität und somit keine Apoptose. Da wir nun in ersten Versuchen die Nekroptose als einen möglichen Schädigungsmechanismus in primären Hepatozyten von Ratten nachweisen konnten, ist es durchaus denkbar, dass die Nekroptose auch bei cholestatischen Erkrankungen in der menschlichen Leber von entscheidender Bedeutung ist. Mit Nec-1 steht somit möglicherweise ein ganz neuer therapeutischer Ansatz in der Behandlung hepatzellulärer Schädigungen zur Verfügung.

5.2.3 Zusammenfassung

In unseren Ergebnissen konnten wir die toxischen Eigenschaften der GCDCA an verschiedenen Spezies nachweisen und bestätigen. Innerhalb der Nager existieren keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich ihrer Caspase-Aktivität und damit ihrer Apoptoseeigenschaften. Auffällig war, dass bei primären humanen Hepatozyten durch GCDCA keine Apoptose induziert werden konnte. Ein Zellschaden war jedoch

nachweislich vorhanden, so dass es möglicherweise auch andere Schädigungswege außer der Apoptose und der Nekrose gibt.

Zwar spricht der erhöhte LDH Gehalt im Medium auch für einen nekrotischen Zellschaden, da wir aber an primären Rattenhepatozyten die Nekroptose als Schädigungsweg nachweisen konnten, könnte diese potenziell auch beim Menschen wichtig sein.

Es ist folglich notwendig, die Nekroptose an humanen Hepatozyten näher zu untersuchen, um mit dem RIP-1 Inhibitor Nec-1 einen eventuell ganz neuen Therapieansatz bei der Behandlung cholestatischer Erkrankungen zur Verfügung zu haben.

6 Zusammenfassung

Die Akkumulation toxischer Gallensäuren in der Leber ist entscheidend für die Zellschädigung bei Cholestase. Die daraus resultierende Gallensäuren-induzierte Apoptose ist einer der wichtigsten Pathomechanismen bei diesen Erkrankungen.

Die wichtigsten chronisch cholestatischen Erkrankungen beim Erwachsenen sind die primär biliäre Zirrhose (PBC) und die primäre sklerosierende Cholangitis (PSC). Während bei der PBC immerhin 50 % der Patienten von einer Behandlung mit der Ursodeoxycholsäure (UDCA) profitieren, existieren derzeit für die PSC keine medikamentösen Therapiemöglichkeiten. Es ist daher dringend notwendig, neue Optionen für die Behandlung dieser Krankheiten zu finden.

Die β -Muricholsäure (β MCA) ist eine mehrfach hydroxylierte, sehr hydrophile Gallensäure, die in früheren Studien anti-cholestatische und Gallenstein-auflösende Eigenschaften zeigte. Diese Gallensäure kommt bei Nagern in hohem Maße in deren physiologischen Gallepool vor, spielt aber in der menschlichen Galle keine Rolle und kann darüber hinaus nicht weiter verstoffwechselt werden. Das ist wichtig, da die therapeutisch verwendete UDCA zum Teil in die toxische Litocholsäure metabolisiert wird und dieser Vorgang bei der β MCA nicht auftreten kann.

In unseren Versuchen fokussierten wir uns auf die anti-apoptotischen Eigenschaften der Taurin-konjugierten β MCA ($T\beta$ MCA) und untersuchten diese an Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen, sowie an primären Hepatozyten von Maus und Ratte. Als schädigende Gallensäure diente die Glycin-konjugierte Chenodeoxycholsäure (GCDCA), die Apoptose induzieren kann und bei Cholestase in sehr hohen Konzentrationen zu finden ist. $T\beta$ MCA konnte in allen Zellreihen die durch GCDCA ausgelöste Apoptose verhindern und wirkte somit protektiv. Damit konnten wir erstmals auch anti-apoptotische Fähigkeiten nachweisen.

Mitochondrien spielen während apoptotischer Prozesse eine zentrale Rolle. Hydrophobe Gallensäuren wie die GCDCA können nach Inkubation zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) führen. Dadurch wird der apoptotische Signalweg eingeleitet und die gesamte Zelle geschädigt.

Weiterhin kommt es durch die Inkubation der Hepatozyten mit GCDCA zu einer Translokation des pro-apoptotischen Bcl-2 Proteins Bax vom Zytosol an die Mitochondrien. Dies führt ebenfalls zur Induktion der Apoptose.

Wir konnten an Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen zunächst bestätigen, dass es durch GCDCA zu einem Zusammenbruch des MMP und zu einer Translokation von Bax kommt. Durch eine simultane Inkubation mit T β MCA konnte das MMP stabilisiert und zusätzlich die Translokation von Bax verhindert werden. Durch diesen Mechanismus wurde der apoptotische Signalweg blockiert.

Die antiapoptotischen Eigenschaften der β MCA, die gute Verträglichkeit und die fehlende Metabolisierung könnten die Grundlage für eine neuartige therapeutische Option dieser hydrophilen Gallensäure bei cholestatischen Erkrankungen sein.

Des Weiteren haben wir in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen Spezies Ratte, Maus, Hamster und Mensch hinsichtlich ihrer Caspase-Aktivität untersucht.

Wir konnten in unseren Versuchen die apoptotische Wirkung verschiedener hydrophober Gallensäuren bestätigen und wie erwartet feststellen. Primäre Hamsterhepatozyten werden selten verwendet, obwohl ihre Gallezusammensetzung eine großen Ähnlichkeit zum Menschen zeigt und damit eine interessante Alternative darstellt. Hamsterhepatozyten reagierten jedoch sehr empfindlich auf die GCDCA mit einer hohen Caspase-Aktivität und verhielten sich somit im Vergleich zu den primären humanen Hepatozyten eher gegenteilig. Auch hohe Konzentrationen hydrophober Gallensäuren konnten in humanen Hepatozyten keine Apoptose auslösen. Dennoch konnte eine Zellschädigung durch die Messung der LDH im Medium und durch einen Vitalitätsassay nachgewiesen werden. Deshalb untersuchten wir, ob die Nekroptose hierbei ein möglicher Mechanismus sein könnte. Bei Nekroptose kommt es zwar Todesrezeptoren-abhängig, aber Caspasen-unabhängig zur Zellschädigung. Wir konnten erstmalig an primären Rattenhepatozyten zeigen, dass Nekroptose auch in der Leber eine wichtige Rolle spielt. Bisher ist diese nur *in vitro* an anderen Organen wie z.B. im neuronalen System nachgewiesen worden. Dort konnten Pathomechanismen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen wichtig sind, mit Necrostatin-1 verhindert werden. Daher kann spekuliert werden, dass die Nekroptose auch bei cholestatischen Erkrankungen zu Zellschäden führt. Möglicherweise stünden mit Necrostatin-1 oder anderen Gegenspielern der Nekroptose neue Therapiealternativen zur Verfügung.

7 Abkürzungsverzeichnis

Act D	Actinomycin D
AIF	Apoptosis-inducing factor
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANT	Adenine nucleotide translocator
aP	Alkalische Phosphatase
Apaf	apoptotic protease-activating factor
ASH	alcoholic steatohepatitis
Bad	Bcl-2 agonist of cell death
Bak	Bcl-2 agonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X-factor
βMCA	Beta-Muricholsäure
Bid	BH3-interacting agonist
BRIC	Benigne rezidivierende intrahepatische Cholestase
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	bile salt export pump
CA	Cholsäure
Caspase/casp.	Cysteinyl aspartate-specific proteases
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
Cyto c	Cytochrom c
DCA	Deoxycholsäure
DD	death domain
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death receptor
EGFR	epidermal growth-factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAAs	free fatty acids
FasL	Fas ligand

FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fetales Kälberserum
FXA	Farnesonid X receptor
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GGT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IAP	inhibitor of apoptosis
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LCA	Lithocholsäure
M	Mol
M	Milli-
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mdr	multidrug resistance protein
Min	Minute(n)
MMP	Mitochondriales Membranpotential
MPT	mitochondrial permeability transition
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
μ	Mikro-
n	Nano-
NADPH	nicotinamid adnine dinucleotide phosphate
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
Nf- κ B	nuclear factor kappa B
Ntcp	Na-taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	Organic-anion polypeptide Transporter
P	Palmitic acid
pANCA	Perinukleäre anti-neutrophile cytoplasmatische Autoantikörper
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	phosphate buffered saline
PDC-E2	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PKC	Protein Kinase C
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTP	permeability transition pore
PVDF	Polyvinylidifluorid

PXA	Pregnane X receptor
RIP	receptor interaction protein
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	reactice oxygen species
SD	Standardabweichung
SDS	sodium-dodecyl-sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAC	second mitochondrial activator of caspases
T β MCA	Tauro-beta-Muricholsäure
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TLCA	Taurolithocholsäure
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
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
TRAIL-R	TNF related apoptosis inducing ligand receptor
U	Units/Einheiten
UDCA	Ursodeoxycholsäure

8 Literaturverzeichnis

1. Rust C, Beuers U. Medical treatment of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2005;28:135-45.
2. Kim WR, Ludwig J, Lindor KD. Variant forms of cholestatic diseases involving small bile ducts in adults. *The American journal of gastroenterology* 2000;95:1130-8.
3. Sokol RJ, Devereaux M, Dahl R, Gumprecht E. "Let there be bile"--understanding hepatic injury in cholestasis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2006;43 Suppl 1:S4-9.
4. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World journal of gastroenterology : WJG* 2006;12:4445-51.
5. Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. *In vivo studies in the rat. Gastroenterology* 1991;100:203-11.
6. Kitani K, Ohta M, Kanai S. Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat. *The American journal of physiology* 1985;248:G407-17.
7. Prince MI, James OF. The epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Clinics in liver disease* 2003;7:795-819.
8. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004;127:485-92.
9. Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, et al. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology* 2003;38:1250-7.
10. Corpechot C, Chretien Y, Chazouilleres O, Poupon R. Demographic, lifestyle, medical and familial factors associated with primary biliary cirrhosis. *Journal of hepatology* 2010;53:162-9.
11. Walker JG, Doniach D, Roitt IM, Sherlock S. Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis. *Lancet* 1965;1:827-31.
12. Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos J, Kloppel W. ATPase-associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1982;2:1423-6.
13. Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *Journal of immunology* 1987;138:3525-31.
14. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1988;1:1067-70.
15. Hohenester S, Oude-Elferink RP, Beuers U. Primary biliary cirrhosis. *Seminars in immunopathology* 2009;31:283-307.
16. Hirschfield GM. Diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2011;25:701-12.
17. Poupon R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update. *Journal of hepatology* 2010;52:745-58.
18. Wiesner RH, LaRusso NF. Clinicopathologic features of the syndrome of primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1980;79:200-6.

19. Ludwig J, MacCarty RL, LaRusso NF, Krom RA, Wiesner RH. Intrahepatic cholangiectases and large-duct obliteration in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1986;6:560-8.
20. Beuers U, Kullak-Ublick GA, Pusl T, Rauws ER, Rust C. Medical treatment of primary sclerosing cholangitis: a role for novel bile acids and other (post-)transcriptional modulators? *Clinical reviews in allergy & immunology* 2009;36:52-61.
21. Escorsell A, Pares A, Rodes J, Solis-Herruzo JA, Miras M, de la Morena E. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis in Spain. Spanish Association for the Study of the Liver. *Journal of hepatology* 1994;21:787-91.
22. Karlsen TH, Schrumpf E, Boberg KM. Primary sclerosing cholangitis. Best practice & research Clinical gastroenterology 2010;24:655-66.
23. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1998;33:99-103.
24. Broome U, Olsson R, Loof L, et al. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996;38:610-5.
25. Aadland E, Schrumpf E, Fausa O, et al. Primary sclerosing cholangitis: a long-term follow-up study. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1987;22:655-64.
26. Saarinen S, Olerup O, Broome U. Increased frequency of autoimmune diseases in patients with primary sclerosing cholangitis. *The American journal of gastroenterology* 2000;95:3195-9.
27. Schrumpf E, Fausa O, Forre O, Dobloug JH, Ritland S, Thorsby E. HLA antigens and immunoregulatory T cells in ulcerative colitis associated with hepatobiliary disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1982;17:187-91.
28. Chapman RW, Varghese Z, Gaul R, Patel G, Kokinon N, Sherlock S. Association of primary sclerosing cholangitis with HLA-B8. *Gut* 1983;24:38-41.
29. Pollheimer MJ, Halilbasic E, Fickert P, Trauner M. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. Best practice & research Clinical gastroenterology 2011;25:727-39.
30. Mulder AH, Horst G, Haagsma EB, Limburg PC, Kleibeuker JH, Kallenberg CG. Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993;17:411-7.
31. LaRusso NF, Shneider BL, Black D, et al. Primary sclerosing cholangitis: summary of a workshop. *Hepatology* 2006;44:746-64.
32. Chapman R, Fevery J, Kalloo A, et al. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010;51:660-78.
33. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *Journal of hepatology* 2009;51:237-67.
34. Hofmann AF. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement* 1994;204:1-15.
35. Beuers U. Drug insight: Mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology* 2006;3:318-28.
36. Leuschner U, Leuschner M, Sieratzki J, Kurtz W, Hubner K. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up. A pilot study. *Digestive diseases and sciences* 1985;30:642-9.
37. Poupon R, Chretien Y, Poupon RE, Ballet F, Calmus Y, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987;1:834-6.

38. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990;12:1216-21.
39. Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, et al. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989;97:1268-74.
40. Poupon RE, Balkau B, Eschwege E, Poupon R. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group. *The New England journal of medicine* 1991;324:1548-54.
41. Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, et al. The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1994;19:1149-56.
42. Pares A, Caballeria L, Rodes J, et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver. *Journal of hepatology* 2000;32:561-6.
43. Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:884-90.
44. Hempfling W, Dilger K, Beuers U. Systematic review: ursodeoxycholic acid--adverse effects and drug interactions. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2003;18:963-72.
45. Corpechot C, Chazouilleres O, Poupon R. Early primary biliary cirrhosis: biochemical response to treatment and prediction of long-term outcome. *Journal of hepatology* 2011;55:1361-7.
46. Leuschner M, Guldetuna S, You T, Hubner K, Bhatti S, Leuschner U. Ursodeoxycholic acid and prednisolone versus ursodeoxycholic acid and placebo in the treatment of early stages of primary biliary cirrhosis. *Journal of hepatology* 1996;25:49-57.
47. Mitchison HC, Bassendine MF, Malcolm AJ, Watson AJ, Record CO, James OF. A pilot, double-blind, controlled 1-year trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis: hepatic improvement but greater bone loss. *Hepatology* 1989;10:420-9.
48. Leuschner M, Maier KP, Schlichting J, et al. Oral budesonide and ursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis: results of a prospective double-blind trial. *Gastroenterology* 1999;117:918-25.
49. Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, et al. Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: a three-year randomized trial. *Hepatology* 2005;41:747-52.
50. Angulo P, Jorgensen RA, Keach JC, Dickson ER, Smith C, Lindor KD. Oral budesonide in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2000;31:318-23.
51. Hempfling W, Grunhage F, Dilger K, Reichel C, Beuers U, Sauerbruch T. Pharmacokinetics and pharmacodynamic action of budesonide in early- and late-stage primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2003;38:196-202.
52. Christensen E, Neuberger J, Crowe J, et al. Beneficial effect of azathioprine and prediction of prognosis in primary biliary cirrhosis. Final results of an international trial. *Gastroenterology* 1985;89:1084-91.
53. Lombard M, Portmann B, Neuberger J, et al. Cyclosporin A treatment in primary biliary cirrhosis: results of a long-term placebo controlled trial. *Gastroenterology* 1993;104:519-26.

54. Hendrickse MT, Rigney E, Giaffer MH, et al. Low-dose methotrexate is ineffective in primary biliary cirrhosis: long-term results of a placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 1999;117:400-7.
55. Beuers U, Spengler U, Kruis W, et al. Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 1992;16:707-14.
56. Lindor KD. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. *The New England journal of medicine* 1997;336:691-5.
57. Olsson R, Boberg KM, de Muckadell OS, et al. High-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis: a 5-year multicenter, randomized, controlled study. *Gastroenterology* 2005;129:1464-72.
58. Fickert P, Wagner M, Marschall HU, et al. 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2006;130:465-81.
59. Hofmann AF, Zakko SF, Lira M, et al. Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans. *Hepatology* 2005;42:1391-8.
60. Hofmann AF, Hagey LR, Krasowski MD. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *Journal of lipid research* 2010;51:226-46.
61. Sacquet E, Parquet M, Riottot M, Raizman A, Nordlinger B, Infante R. Metabolism of beta-muricholic acid in man. *Steroids* 1985;45:411-26.
62. Montet JC, Parquet M, Sacquet E, Montet AM, Infante R, Amic J. beta-Muricholic acid; potentiometric and cholesterol-dissolving properties. *Biochimica et biophysica acta* 1987;918:1-10.
63. Wang DQ, Tazuma S. Effect of beta-muricholic acid on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones in C57L/J mice. *Journal of lipid research* 2002;43:1960-8.
64. Milkiewicz P, Roma MG, Elias E, Coleman R. Hepatoprotection with tauroursodeoxycholate and beta muricholate against taurolithocholate induced cholestasis: involvement of signal transduction pathways. *Gut* 2002;51:113-9.
65. Katagiri K, Nakai T, Hoshino M, et al. Tauro-beta-muricholate preserves choleresis and prevents taurocholate-induced cholestasis in colchicine-treated rat liver. *Gastroenterology* 1992;102:1660-7.
66. Botham KM, Boyd GS. The metabolism of chenodeoxycholic acid to beta-muricholic acid in rat liver. *European journal of biochemistry / FEBS* 1983;134:191-6.
67. Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Mechanisms of cholestasis. *Clinics in liver disease* 2000;4:357-85.
68. Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *Journal of hepatology* 2000;32:3-18.
69. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *The New England journal of medicine* 1998;339:1217-27.
70. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological reviews* 2003;83:633-71.
71. Konig J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 1999;29:1156-63.
72. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, et al. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 1997;113:255-64.

73. Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2010;42:409-18.
74. Kobak GE, Dahl R, Devereaux MW, et al. Increased susceptibility of fat-laden Zucker-rat hepatocytes to bile acid-induced oncotic necrosis: an in vitro model of steatocholestasis. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 2005;145:247-62.
75. Patel T, Bronk SF, Gores GJ. Increases of intracellular magnesium promote glycochenodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *The Journal of clinical investigation* 1994;94:2183-92.
76. Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:20210-6.
77. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010;11:700-14.
78. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current opinion in cell biology* 2010;22:263-8.
79. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 1995;146:3-15.
80. Greim H, Trulzsch D, Czygan P, et al. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 1972;63:846-50.
81. Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ. Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *The Journal of clinical investigation* 1993;92:17-24.
82. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, et al. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:38610-8.
83. Higuchi H, Miyoshi H, Bronk SF, Zhang H, Dean N, Gores GJ. Bid antisense attenuates bile acid-induced apoptosis and cholestatic liver injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2001;299:866-73.
84. Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, et al. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* 2004;39:1563-73.
85. Rust C, Wild N, Bernt C, Vennegeerts T, Wimmer R, Beuers U. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:2908-16.
86. Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1995;272:930-8.
87. Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI, Bronk SF. Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochimica et biophysica acta* 1998;1366:167-75.
88. Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World journal of gastroenterology : WJG* 2012;18:4985-93.
89. Yoon JH, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *Journal of hepatology* 2002;37:400-10.
90. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 2005;129:2009-31.

91. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *The American journal of medicine* 2000;108:567-74.
92. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972;26:239-57.
93. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
94. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research* 2000;45:528-37.
95. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Current opinion in cell biology* 1995;7:337-43.
96. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Seminars in liver disease* 1998;18:105-14.
97. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996;85:781-4.
98. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010;11:700-14.
99. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *Journal of cell science* 1994;107 (Pt 12):3569-77.
100. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000;407:796-801.
101. Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* 2001;1551:F1-37.
102. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology today* 1997;18:44-51.
103. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993;364:806-9.
104. Manning FC, Patierno SR. Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer investigation* 1996;14:455-65.
105. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-8.
106. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-8.
107. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005;54:1024-33.
108. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999;29:1-4.
109. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
110. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in cell biology* 1998;8:267-71.
111. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
112. 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* 1998;94:481-90.
113. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences* 1997;22:299-306.
114. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004;117:561-74.
115. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews Cancer* 2002;2:647-56.

116. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-607.
117. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell and tissue research* 2001;306:347-61.
118. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:11615-23.
119. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *The Journal of cell biology* 2001;153:1265-76.
120. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* 2001;8:705-11.
121. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & development* 1996;10:2859-69.
122. Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *Journal of cellular biochemistry* 1995;58:181-90.
123. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995;21:1725-41.
124. Feldmann G. Liver apoptosis. *Journal of hepatology* 1997;26 Suppl 2:1-11.
125. Rodrigues CM, Steer CJ. Mitochondrial membrane perturbations in cholestasis. *Journal of hepatology* 2000;32:135-41.
126. Loo DT, Rillema JR. Measurement of cell death. *Methods in cell biology* 1998;57:251-64.
127. Shimamatsu K, Wanless IR. Role of ischemia in causing apoptosis, atrophy, and nodular hyperplasia in human liver. *Hepatology* 1997;26:343-50.
128. Kroemer G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell death and differentiation* 1997;4:443-56.
129. Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature cell biology* 1999;1:E209-16.
130. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS letters* 1996;384:53-7.
131. Narita M, Shimizu S, Ito T, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:14681-6.
132. Schaffner F, Bacchin PG, Hutterer F, et al. Mechanism of cholestasis. 4. Structural and biochemical changes in the liver and serum in rats after bile duct ligation. *Gastroenterology* 1971;60:888-97.
133. Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1993;265:392-400.
134. Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB, Farber JL. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:13791-8.
135. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting

- mitochondrial membrane depolarization and channel formation. Cell death and differentiation 1999;6:842-54.
136. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nature medicine 1997;3:614-20.
137. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. Molecular medicine 1998;4:165-78.
138. Glasova H, Berghaus TM, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid mobilizes alpha-PKC after uptake in human HepG2 hepatoma cells. European journal of clinical investigation 2002;32:437-42.
139. Fischer S, Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Koebe HG. Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 1996;251:173-86.
140. Scholmerich J, Becher MS, Schmidt K, et al. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties--studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. Hepatology 1984;4:661-6.
141. Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society 1999;14:24-9.
142. Benz C, Angermuller S, Tox U, et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytosis in rat hepatocytes. Journal of hepatology 1998;28:99-106.
143. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. Clinical science 2011;121:523-44.
144. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. World journal of gastroenterology : WJG 2009;15:1677-89.
145. Palmeira CM, Rolo AP. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. Toxicology 2004;203:1-15.
146. Hohenester S, Wenniger LM, Paulusma CC, et al. A biliary HCO₃⁻ umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. Hepatology 2012;55:173-83.
147. Kanai S, Ohta M, Kitani K, Sato Y. Tauro beta-muricholate is as effective as tauroursodeoxycholate in preventing taurochenodeoxycholate-induced liver damage in the rat. Life sciences 1990;47:2421-8.
148. Ohiwa T, Katagiri K, Hoshino M, Hayakawa T, Nakai T. Tauroursodeoxycholate and tauro-beta-muricholate exert cytoprotection by reducing intrahepatocyte taurochenodeoxycholate content. Hepatology 1993;17:470-6.
149. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. Nature medicine 2000;6:513-9.
150. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science 1998;281:2027-31.
151. Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. Hepatology 2005;42:5-13.
152. Unger RH, Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. Biochimica et biophysica acta 2002;1585:202-12.

153. Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *Journal of hepatology* 2003;39:978-83.
154. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:12093-101.
155. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiological reviews* 2010;90:1165-94.
156. Iwaki T, Ishizaki K, Kinoshita S, et al. Protective effects of ursodeoxycholic acid on chenodeoxycholic acid-induced liver injury in hamsters. *World journal of gastroenterology : WJG* 2007;13:5003-8.
157. Kasbo J, Saleem M, Perwaiz S, et al. Biliary, fecal and plasma deoxycholic acid in rabbit, hamster, guinea pig, and rat: comparative study and implication in colon cancer. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2002;25:1381-4.
158. Khalou J, Riottot M, Parquet M, Verneau C, Lutton C. Biodynamics of cholesterol and bile acids in the lithiasic hamster. *The British journal of nutrition* 1991;66:479-92.
159. Gripon P, Rumin S, Urban S, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:15655-60.
160. Cerec V, Glaise D, Garnier D, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 2007;45:957-67.
161. McGill MR, Yan HM, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins DE, Jaeschke H. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 2011;53:974-82.
162. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-biological interactions* 2007;168:66-73.
163. Aninat C, Piton A, Glaise D, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2006;34:75-83.
164. Hillaire S, Ballet F, Franco D, Setchell KD, Poupon R. Effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 1995;22:82-7.
165. Benz C, Angermuller S, Otto G, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. *European journal of clinical investigation* 2000;30:203-9.
166. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *The Journal of clinical investigation* 1998;101:2790-9.
167. Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology* 2005;1:112-9.
168. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 2008;135:1161-3.
169. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenberghe P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 2009;16:3-11.

170. Miao B, Degterev A. Methods to analyze cellular necroptosis. *Methods in molecular biology* 2009;559:79-93.
171. Chan FK, Shisler J, Bixby JG, et al. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:51613-21.
172. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 2008;135:1311-23.
173. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS letters* 2005;579:3287-96.
174. Xu X, Chua CC, Kong J, et al. Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. *Journal of neurochemistry* 2007;103:2004-14.
175. Li Y, Yang X, Ma C, Qiao J, Zhang C. Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neuroscience letters* 2008;447:120-3.

9 Lebenslauf

Name

Kleiss

Vorname

Carl-Philipp Dieter Gerhard

Geburtstag

15. Juni 1984

Staatsangehörigkeit

Deutsch

Schulbildung

1990 bis 1994

Grundschule Mannheim-Käfertal

1994 bis 2003

Lessing-Gymnasium, Mannheim

2003

Abitur

Zivildienst

2003 bis 2004

Zivildienst

Universitätsausbildung

2004 bis 2005

Studium der Biologie, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

2005

Beginn des Studiums der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München

2008

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2012

Erteilung der Approbation als Arzt

Promotion

2009 - 2012

Anfertigung der vorliegenden Promotionschrift im Labor für hepatobiliäre Forschung, Medizinische Klinik II, Klinikum der Universität Campus Großhadern (Leitung: Prof. Dr. Ch. Rust)

Praktisches Jahr 20.06.2011 – 17.06.2012

- | | |
|-----------|---|
| 1.Tertial | Medizinische Klinik II/III, Klinikum der Universität Großhadern |
| 2.Tertial | Chirurgische Klinik, Klinikum der Universität Großhadern |
| 3.Tertial | Anästhesie, Klinikum Dritter Orden |

Publikationen

Denk GU*, **Kleiss CP***, Wimmer R, Vennegeerts T, Reiter FP, Schulz S, Zischka H, Rust C. Tauro- β -muricholic acid restricts bile acid-induced hepatocellular apoptosis by preserving the mitochondrial membrane potential. Biochem Biophys Res Comm 2012;424:758-764.

*Geteilte Erstautorschaft

Kurzfassungen

Kleiss CP, vanWenum M, Wimmer R, Vennegeerts T, Hofmann AF, Rust C. Species-dependant bile acid induced apoptosis: a comparison of human, mouse and rat hepatocytes. 45th Annual Meeting of the European-Association-for-the-Study-of-the-Liver (EASL) Vienna, Austria. J Hepatol 2010; 52:368

Kleiss CP, vanWenum M, Wimmer R, Vennegeerts T, Hofmann AF, Rust C. Speziesabhängige Unterschiede bei durch Gallensäuren induzierter Apoptose in der Leber: Ein Vergleich von Mensch, Maus und Ratte. 65. Jahrestagung der DGVS Stuttgart.Z Gastroenterol 2010;48:P309

Kleiss CP, Denk GU, Wimmer R, Zischka H, Rust C. Tauro- β -muricholic acid reduces glycochenodeoxycholic acid induced apoptosis in a human hepatoma cell line by restoring the mitochondrial membrane. 46th Annual Meeting of the European-Association-for-the-Study-of-the-Liver (EASL) Berlin, Germany. J Hepatol 2011; 54:274

Kleiss CP, Denk GU, Wimmer R, Zischka H, Rust C. Tauro- β -Muricholsäure reduziert in einer humanen Hepatomzelllinie die durch Glycochenodeoxycholsäure induzierte Apoptose. 66. Jahrestagung der DGVS Leipzig. Z Gastroenterol 2011;49: P401

Kleiss CP, Wimmer R, Vennegeerts T, Denk GU, Rust C.

Primary human hepatocytes are damaged by hydrophobic bile acids in a caspase-independent mechanism. 47th Annual Meeting of the European-Association-for-the-Study-of-the-Liver (EASL) Barcelona, Spain. J Hepatol 2012; 56:136

Kleiss CP, Wimmer R, Vennegeerts T, Denk GU, Rust C.

Hydrophobe Gallensäuren schädigen primäre humane Hepatozyten durch einen Caspase-unabhängigen Mechanismus. 67.Jahrestagung der DGVS, Hamburg.

Z Gastroenterol 2012; 50 - K039

10 Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Ch. Rust, der mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe die vorliegende Dissertation anzufertigen. Es war immer eine Freude und hohe Motivation, mit ihm die erzielten Ergebnisse zu diskutieren und das weitere Vorgehen festzulegen. Ohne seinen Einsatz und seine fantastische Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich mich auch bei ihm für seine grenzenlose Förderung bezüglich der aus dieser Dissertation entstandenen Veröffentlichungen bedanken.

Ebenfalls ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Ralf Wimmer, der durch seine unendliche Geduld und Leidenschaft dieses vorliegende Werk maßgeblich mitbetreut hat. Herrn Timo Vennegeerts danke ich für seine vielen guten Ratschläge, Ideen und Anregungen und die Arbeit, die er investiert hat. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Renate Artmann für die angenehme Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. med. Gerald Denk gilt mein großer Dank für die vielen Diskussionen und Hilfestellungen in problematischen Situationen. Durch ihn gab es immer wieder neue Lösungsansätze.

Vielen Dank nochmal an das gesamte Laborteam für die vielen schönen Augenblicke auch abseits der Labortätigkeiten. Eure Leidenschaft und phänomenale Unterstützung war immer eine ganz besondere Motivation.

Zum Abschluss bedanke ich mich bei meiner ganzen Familie und meinen Freunden für die mir entgegengebrachte Hilfe und Unterstützung während der letzten Monate und Jahre. Auch hier gilt, dass ohne diese außergewöhnliche Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht hätte entstehen können.