

**Charakterisierung der durch hydrophobe Gallensäuren
induzierten Leberzellschädigung und deren Modulation durch
Phosphatidylinositol-3-Kinasen und Sulfasalazin**

Kris Benjamin Bauchmüller

2005

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

**Charakterisierung der durch hydrophobe Gallensäuren
induzierten Leberzellschädigung und deren Modulation durch
Phosphatidylinositol-3-Kinasen und Sulfasalazin**

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

vorgelegt von
Kris Benjamin Bauchmüller

aus
Mannheim

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Beuers
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. A. Lebeau

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Th. Lang
Prof. Dr. med. S. Werner

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

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2005

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

„Ich weiss, dass die Galle ein nothwendig
Glied des Lebens, ein Balsam des Bluts und
der Leber ist.“

(Johann B. van Helmont, 1683)

1	EINLEITUNG	1
1.1	Theoretische Grundlagen	1
1.1.1	Chronische cholestatische Leberkrankheiten	1
1.1.1.1	Pathophysiologische Hintergründe und therapeutische Ansätze.....	1
1.1.1.2	Hepatobiliäre Transportmechanismen	2
1.1.1.3	Mechanismen der Leberzellschädigung bei Cholestase.....	4
1.1.2	Apoptotischer Zelltod	6
1.1.2.1	Bedeutung der Apoptose für den Organismus	7
1.1.2.2	Molekulare Grundlagen und Signalwege der Apoptose.....	8
1.1.2.3	Apoptose in der Leberzelle und zelluläre Überlebenswege.....	14
1.1.2.4	Einfluss von Gallensäuren auf die hepatozelluläre Apoptose.....	17
1.1.3	Phosphatidylinositol-3-Kinasen.....	20
1.1.4	Sulfasalazin als Modulator intrazellulärer Signaltransduktion	22
1.2	Fragestellung der Arbeit	25
2	METHODIK	26
2.1	Untersuchungen am Modell Ntcp-transfizierter HepG2-Zellen	26
2.1.1	Kultivierung der Zellen	26
2.1.2	Stabile Transfektion der humanen HepG2-Zellen mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt	26
2.1.3	Caspase 3/7 - Aktivitätsassay.....	28
2.1.4	Darstellung aktivierter Caspase 3 in der Immunzytochemie	29
2.1.5	Bestimmung der [³ H]-Taurocholsäure-Aufnahme	30
2.1.6	NF-κB - Luciferase-Reportergen-Assay.....	31
2.2	Untersuchungen am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber	33
2.2.1	Technik der isolierten Rattenleberperfusion	33
2.2.2	Versuchsprotokoll der Perfusion	35
2.2.3	Bestimmung der biliären Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP	37
2.2.4	Aktivitätsmessung der LDH im hepatovenösen Effluat	39
2.2.5	Aktivitätsmessung der GPT im hepatovenösen Effluat	40
2.2.6	Bestimmung der Gallensäurenkonzentration im hepatovenösen Effluat..	42
2.2.7	Darstellung der aktivierten Caspase 3 und des Zytokeratin 18-Filaments im Lebergewebe	44
2.2.8	Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der PKB	45
2.3	Materialien	47

2.4	Tiere	48
2.5	Statistik.....	48
3	ERGEBNISSE.....	49
3.1	Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung und Rolle der PI₃-Kinasen im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber	49
3.1.1	Effekte der hydrophoben Gallensäure TCDCA	49
3.1.1.1	Gallenfluss.....	49
3.1.1.1.1	Kontrollen	49
3.1.1.1.2	TCDCA.....	51
3.1.1.2	Biliäre Sekretion der Mrp2-Substrats GS-DNP	52
3.1.1.2.1	Kontrollen	52
3.1.1.2.2	TCDCA.....	53
3.1.1.3	Aktivität der LDH und der GPT im hepatovenösen Effluat.....	55
3.1.1.4	Aktivierte Caspase 3 und Zytokeratin 18-Filament im Lebergewebe...	57
3.1.1.5	Phosphorylierung der PKB	59
3.1.1.6	Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat.....	60
3.1.2	Effekte der hydrophoben Gallensäure GCDCA	61
3.1.2.1	Gallenfluss.....	61
3.1.2.1.1	Kontrollen	61
3.1.2.1.2	GCDCA	61
3.1.2.2	Biliäre Sekretion der Mrp2-Substrats GS-DNP.....	64
3.1.2.2.1	Kontrollen	64
3.1.2.2.2	GCDCA	64
3.1.2.3	Aktivität der LDH und der GPT im hepatovenösen Effluat.....	67
3.1.2.4	Aktivierte Caspase 3 und Zytokeratin 18-Filament im Lebergewebe...	70
3.1.2.5	Phosphorylierung der PKB	72
3.1.2.6	Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat.....	73
3.2	Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung und deren Modulation durch Sulfasalazin	74
3.2.1	Untersuchungen im Modell der humanen Hepatomzelllinie HepG2	74
3.2.1.1	Apoptose	74
3.2.1.1.1	Effekte der hydrophoben Gallensäuren TCDCA und GCDCA.....	74
3.2.1.1.2	Effekt von Sulfasalazin auf die Gallensäuren-induzierte Apoptose .	76

3.2.1.1.3	Effekte der Sulfasalazin-Spaltprodukte 5-ASA und Sulfapyridin auf die Gallensäuren-induzierte Apoptose	78
3.2.1.1.4	Effekt von Sulfasalazin auf die TNF- α /Actinomycin D-vermittelte Apoptose	79
3.2.1.2	Gallensäureaufnahme	80
3.2.1.3	NF- κ B-Aktivität	81
3.2.2	Untersuchungen im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber	82
3.2.2.1	Gallenfluss.....	82
3.2.2.1.1	Kontrollen	82
3.2.2.1.2	Effekt von GCDCA	84
3.2.2.1.3	Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA und Sulfasalazin	84
3.2.2.1.4	Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA, Sulfasalazin und Wortmannin	87
3.2.2.2	Aktivität der LDH und der GPT im hepatovenösen Effluat.....	89
3.2.2.2.1	Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA und Sulfasalazin	89
3.2.2.2.2	Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA, Sulfasalazin und Wortmannin	92
3.2.2.3	Aktivierte Caspase 3 und Zytokeratin 18-Filament im Lebergewebe...	94
3.2.2.4	Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat.....	97
3.3	Übersichtsabbildungen	99
4	DISKUSSION.....	102
4.1	Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung und Einfluss der PI₃-Kinasen.....	103
4.2	Einfluss von Sulfasalazin auf die Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung	113
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	121
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	124
7	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	150
8	LEBENS LAUF	153
9	DANKSAGUNGEN	154

1 EINLEITUNG

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Chronische cholestatische Leberkrankheiten

Cholestase ist definiert als eine Beeinträchtigung des Gallenflusses, die zu einer Erhöhung gallenpflichtiger Substanzen im Blut und einem relativen Mangel von für die Verdauung wichtigen Gallenbestandteilen im Intestinum führt. Sie ist führendes Kennzeichen einer Reihe von Krankheitsbildern, die als chronische cholestatische Leberkrankheiten bezeichnet werden und in der Regel progredient verlaufen. Die betroffenen Patienten entwickeln nicht selten eine biliäre Leberzirrhose mit drohendem Leberversagen, sodass in der Endphase der Erkrankung eine Lebertransplantation unumgänglich werden kann. Im Kindesalter werden die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 1-3, die Gallengangsatresie und das Alagille-Syndrom zu dieser Krankheitsgruppe gezählt. Bei erwachsenen Patienten stellen die primär biliäre Zirrhose (PBC) und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) die häufigsten chronischen cholestatischen Leberkrankheiten dar.

1.1.1.1 Pathophysiologische Hintergründe und therapeutische Ansätze

Schon seit langem wird der Akkumulation potentiell toxischer Gallensäuren in den Hepatozyten eine besondere Bedeutung für die Entstehung der Leberzellschädigung, die man bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten beobachten kann, beigemessen [88]. Pathogenetisch scheint bei verschiedenen cholestatischen Leberkrankheiten eine Schädigung sowohl der Cholangiozyten als auch der Hepatozyten vorzuliegen. So rufen hydrophobe Gallensäuren im Tiermodell eine hepatozelluläre Cholestase und Leberschädigung hervor [79, 88, 101]. Darüber hinaus verstärken sie vorbestehende Gallengangsschäden [199]. Untersuchungen in einem Rattenmodell zeigten, dass das Ausmaß dieser Schädigung mit den hepatischen Konzentrationen von Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure nach deren Infusion korreliert [170].

Die derzeit etablierte Therapie der chronischen cholestatischen Leberkrankheiten besteht in der Gabe von Ursodeoxycholsäure (UDCA). UDCA ist eine physiologische Gallensäure, die wegen ihrer litholytischen Eigenschaften schon seit etwa 30 Jahren zur Therapie von Cholesteringallensteinen eingesetzt wird. Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit und der Beobachtung, dass UDCA bei Patienten mit chronischer Hepatitis C die Serumspiegel der Transaminasen senken konnte [118], wurde sie Ende der 80er Jahre erstmals bei Patienten mit chronischen cholestatischen Leberkrankheiten wie der PBC verabreicht [117, 153]. Die erfolgsversprechenden Ergebnisse dieser frühen Studien führten zu weiteren Untersuchungen, die den positiven therapeutischen Effekt von UDCA bestätigen konnten. So fand man bei Patienten mit PBC eine Verbesserung der Serumleberwerte, eine verlangsamte Progression der histologischen Veränderungen und der Zirrhosebildung, eine Reduktion der Komplikationen einer Leberzirrhose und eine Verlängerung des transplantatfreien Überlebens bei zu vernachlässigenden Nebenwirkungen [22]. UDCA ist eine physiologische, hydrophile, nichttoxische Gallensäure und macht unter Normalbedingungen ca. 3 % des menschlichen Gallensäurenpoools aus. Nach Gabe der empfohlenen therapeutischen Dosis von 13-15 mg/kg/Tag bei PBC-Patienten ändert sich die Zusammensetzung der Galle zugunsten der nichttoxischen UDCA, die dann zur prädominanten Gallensäure in Galle und Serum wird [85]. Darin liegt ein Grund für den therapeutischen Erfolg von UDCA. Darüber hinaus scheint UDCA jedoch auch als potenter intrazellulärer Signalmediator von großer Bedeutung zu sein.

Drei Wirkmechanismen der UDCA gelten derzeit als mögliche Vermittler ihrer anticholestatischen Wirkung: Schutz der Cholangiozyten vor Schädigung durch toxische hydrophobe Gallensäuren, Stimulation der bei Cholestase beeinträchtigten hepatozellulären Sekretion und eine antiapoptotische Wirkung [22, 115].

1.1.1.2 Hepatobiliäre Transportmechanismen

Eine wesentliche Aufgabe der Hepatozyten ist der gerichtete Transport einer Vielzahl von Substanzen vom Blut in die Galle. Unter Normalbedingungen geschieht dies durch die ausgewogene Expression bestimmter Transportsysteme an der sinusoidalen (basolateralen) und der kanalikulären (apikalen) Membran. Die

sekretorische Kapazität des Hepatozyten wird von der Anzahl und Aktivität der Transportproteine bestimmt, deren Expression unter Cholestase komplexe Veränderungen erfährt. Die mangelnde Ausscheidung hydrophober Gallensäuren und Elimination anderer toxischer Substanzen wird dabei zum entscheidenden Problem und zur Hauptursache der Leberzellschädigung (siehe **Kap. 1.1.1.3**).

Die Aufnahme der Gallensäuren über die sinusoidale Plasmamembran wird von einem Na^+ -abhängigen Transportsystem, dem „ Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptide“ (Ntcp), und einer Familie von Na^+ -unabhängigen Transportern, den sog. „organic anion transporting polypeptides“ (Oatps) bewerkstelligt. Ntcp ist das prädominante sinusoidale Transportsystem für Gallensäuren, während den Oatps neben dem Gallensäuretransport eine zentrale Rolle in der Extraktion organischer Anionen und zahlreicher Medikamente zufällt [111]. Auf der kanalikulären Seite des Hepatozyten erfolgt die Exkretion monovalenter Gallensäuren hauptsächlich über die sog. „bile salt export pump“ (Bsep), während divalente Gallensäuren gemeinsam mit organischen Anionen über die Konjugatexportpumpe Mrp2 sezerniert werden. Phospholipide werden über das „multidrug resistance protein“ Mdr2 (in Ratte/Maus) bzw. MDR3 (beim Menschen) in die Galle ausgeschieden, wo sie gemeinsam mit Gallensäuren und Cholesterin gemischte Mizellen bilden. An der basolateralen Seite existiert über weitere Isoformen der multidrug resistance-associated proteins (Mrp1, Mrp3) ein alternativer Weg der Ausscheidung von Gallensäuren und anderer organischer Anionen [197] (siehe **Abbildung 1**).

Unter Cholestase zeigen die Gallensäuretransporter eine adaptive Antwort auf die intrazelluläre Belastung mit Gallensäuren, die vermutlich dem Schutz der Hepatozyten vor einer weiteren Akkumulation toxischer Substanzen dient. So wird Ntcp beispielsweise herunterreguliert [29, 66, 70], was die weitere Aufnahme von Gallensäuren vermindert. Die Expression von Bsep an der kanalikulären Membran und damit die Gallensäuresekretion wird jedoch aufrechterhalten. Da Mrp2 an der apikalen Membran allerdings stark herunterreguliert wird, werden kompensatorisch die basolateralen Effluxsysteme für organische Anionen (Mrp1, Mrp3) und auch Gallensäurenkonjugate (Mrp3) hochreguliert [105, 144, 196] (siehe **Abbildung 1**).

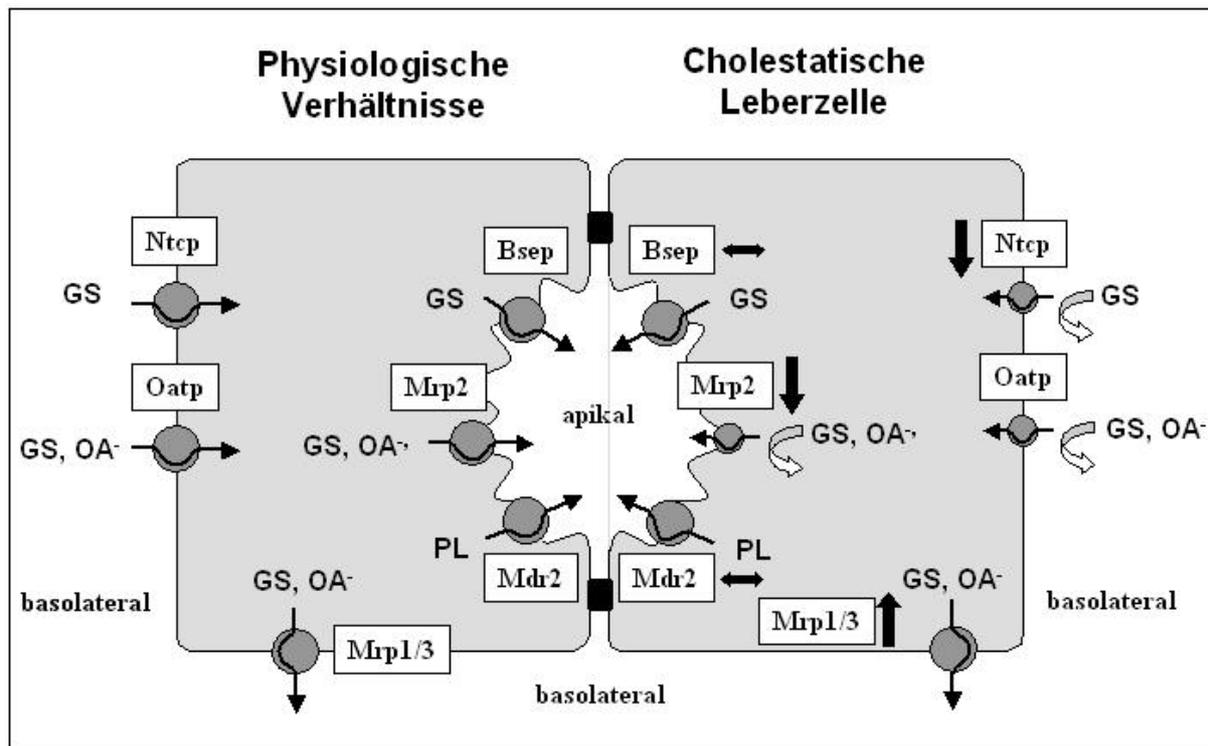


Abbildung 1: Hepatobiliäre Transportmechanismen

Die Expression der Transportproteine wird vermutlich über vielfältige transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Gallensäuren scheinen in diesem Zusammenhang auf beiden Ebenen wichtige Mediatoren zu sein [197].

1.1.1.3 Mechanismen der Leberzellschädigung bei Cholestase

Die Mechanismen des hepatischen Zelluntergangs bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten sind nach wie vor unklar. Prinzipiell gibt es in den Leberzellen wie in jeder anderen Körperzelle zwei verschiedene Möglichkeiten des Zelluntergangs. Zum einen den nekrotischen Zelltod und zum anderen die Apoptose, das geordnete Sterben der Zelle nach einem festgelegten Programm (siehe **Kap. 1.1.2**). Nekrose spielt vermutlich eher bei der extrazellulär vermittelten Art der cholestatischen Leberzellschädigung eine Rolle. Dieser Annahme liegt die Vorstellung zugrunde, dass die Membranen von Hepatozyten und Cholangiozyten grundsätzlich empfindlich gegenüber den toxischen Effekten der hydrophoben Gallensäuren sind. Die Spiegel der hydrophoben Gallensäuren in der Galle liegen gegenüber ihren entsprechenden Serumspiegeln unter physiologischen Bedingungen ca. 1000-fach höher. Für die

Ausbildung eines effektiven Schutzes der Gallengänge spielen Phospholipide eine maßgebliche Rolle. Sie werden von den Hepatozyten über deren apikale Membran in die Galle sezerniert. Dazu ist beim Menschen das Membranprotein MDR3 nötig (siehe **Kap. 1.1.1.2**), dem in der Maus der Transporter Mdr2 entspricht (siehe **Abbildung 1**). Eine Reihe von Studien mit Mdr2-knockout-Mäusen konnte die Bedeutung der protektiven Eigenschaften der Phospholipide belegen: Mäuse, die heterozygot für das ausgeschaltete Allel waren, zeigten keine Hinweise für eine Leberschädigung, obgleich die Spiegel der Phospholipide in der Galle auf die Hälfte zurückgingen. Mäuse, die homozygot für das ausgeschaltete Mdr2-Gen waren, entwickelten aufgrund der kompletten Unfähigkeit, Phospholipide in die Galle zu sezernieren, eine chronische nichteitriges Cholangitis, die den Veränderungen der chronischen Cholestase beim Menschen ähnelte [180]. Interessanterweise konnten Gallengangsproliferation und portale Entzündungsreaktion in der Mdr2-knockout-Maus durch Fütterung von UDCA deutlich verringert werden [25]. *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass Konjugate der UDCA den schädigenden Effekt hydrophober Gallensäuren auf die Zellmembranen abschwächen, wenn sie in hohen mikromolaren Konzentrationen gegeben werden [71]. Ein entsprechender Mechanismus könnte darin begründet sein, dass die hydrophile UDCA ein Rupturieren der Cholesterin-reichen Modellmembranen verhindert. Da kanalikuläre Membranen ebenfalls reich an Cholesterin sind, wäre das auch in der cholestatischen Leber eine mögliche Erklärung [77]. Allerdings scheint es wahrscheinlicher, dass die Wirkung von UDCA auf die Beeinflussung von Bildung und Struktur einfacher und gemischter Mizellen zurückzuführen ist, als auf eine direkte Membraninteraktion [78]. Millimolare Konzentrationen von Gallensäuren finden sich nur im Lumen der Gallengänge, jedoch nicht in den Hepatozyten [76]. Daher spielen diese extrazellulär wirkenden Schutzmechanismen wohl eher für den Cholangiozyten als für den Hepatozyten eine Rolle. Gallensäuren scheinen aber auch weit unterhalb ihrer kritischen mizellären Konzentration Leberzellschädigung induzieren zu können. Neben dem Modell des extrazellulär vermittelten Zellschadens muss also auch das Konzept einer von intrazellulär hervorgerufenen Zellschädigung bei Cholestase und ihrer Therapie mit UDCA erwogen werden. In der Gallengangs-ligierten Ratte konnte gezeigt werden, dass UDCA die Gallengangsproliferation durch Stimulation eines Ca^{++} - und α -Proteinkinase C (PKC- α)-abhängigen Signalwegs im Cholangiozyten inhibiert [5]. Auffällig ist, dass eine durch TUDCA ausgelöste

Stimulation eingeschränkter hepatozellulärer Sekretion ebenfalls durch Ca^{++} - und PKC- α -abhängige Mechanismen vermittelt zu sein scheint [21, 25, 28]. Konjugate der UDCA könnten daher die Cholangiozyten durch eine Verringerung der cholangiozellulären Konzentration an hydrophoben Gallensäuren schützen [85]. Das wäre auch eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass die Entzündungsreaktion in der Umgebung der Gallengänge bei PBC- und PSC-Patienten unter Therapie mit UDCA weniger stark ausgeprägt sind [27, 36, 73, 147, 154].

Da ausgedehnte Nekrose bei cholestatischen Lebererkrankungen in der Regel nicht zu beobachten ist, wurde von Patel et al. spekuliert, dass der Untergang der Hepatozyten bei Cholestase überwiegend durch Apoptose geschieht [149]. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass apoptotische Merkmale in Lebergewebeproben von Patienten mit PBC häufiger vorhanden sind als bei Kontrollpersonen [104]. Auf die entsprechenden Mechanismen hepatozellulärer Apoptose wird später eingegangen (siehe **Kap. 1.1.2.4**).

1.1.2 Apoptotischer Zelltod

Apoptose ist charakterisiert durch die Fähigkeit einer Zelle, auf ein bestimmtes Signal hin geordnet zu sterben. Die Apoptose ist ein aktiver und energieabhängiger Prozess. Sowohl die auslösenden Momente als auch die Ausführung des programmierten Zelltods unterliegen dabei streng kontrollierten und genetisch determinierten Mechanismen. Der Begriff „Apoptose“ wurde 1972 von Kerr et al. [96] geprägt und leitet sich aus dem Griechischen ab („apo“ = ab, los; „ptosis“ = das Fallen). Er steht für das Abfallen der welkenden Blätter im Herbst. Morphologisch zeichnet sich die apoptotische Zelle durch ihr Loslösen aus dem Zellverband, Schrumpfung und Abrundung, das Auflösen von Mikrovilli, und das passagere Auftreten kleiner Bläschen an der Membran (sog. „membrane blebbing“) aus. Das Zytoskelett wird abgebaut, die Mitochondrien werden zerstört, das Chromatin kondensiert und die DNA wird in ca. 180 bp große Fragmente gespalten. Schließlich kommt es zur Auflösung der Zelle, indem sich kleine Vesikel (sog. „apoptotic bodies“) abschnüren. Phosphatidylserin, das sich normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran befindet, wird auf deren Außenseite transloziert. Dieses

Signal wird von Makrophagen und benachbarten Epithelzellen erkannt, die damit einen Stimulus zur Phagozytose der apoptotischen Körperchen erhalten [186]. Die geschädigten Zellen werden also kontrolliert eliminiert, eine inflammatorische Reaktion wird theoretisch komplett vermieden. Jedoch gibt es Hinweise, dass Apoptose möglicherweise doch nicht so vollkommen „still“ verläuft, wie vormals angenommen (siehe **Kap. 1.1.2.3**).

Obwohl Nekrose und Apoptose primär zwei voneinander unabhängige Vorgänge zu sein scheinen, so gibt es doch einige Hinweise auf mögliche Querverbindungen. So scheinen bestimmte Toxine je nach ihrer Konzentration [107] und dem ATP-Gehalt der Zelle [52, 116] entweder Apoptose oder Nekrose auslösen zu können. Darüber hinaus konnten Vercaemmen et al. zeigen, dass ein proapoptotischer Stimulus nach Blockade der apoptotischen Signalwege auch Nekrose verursachen kann [201].

1.1.2.1 Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Der Mechanismus der Apoptose stellt eine der Grundvoraussetzungen für die Entwicklung und das Überleben eines vielzelligen Organismus dar. Er ist essentieller Bestandteil der physiologischen Prozesse während Embryonalentwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben [72, 132]. Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für die Elimination potentieller Krebszellen, die Vermittlung der Immunabwehr, aber auch ihrer Kontrolle, beispielsweise durch Auslösen autoreaktiver oder inkompetenter Immunzellen [13]. Daher liegt es nahe, dass die Apoptoseregulation auch pathophysiologisch eine bedeutende Rolle spielen kann. Man geht mittlerweile davon aus, dass die Fehlsteuerung apoptotischer Mechanismen zur Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen beiträgt. Exemplarisch seien hier für eine Überaktivierung der Apoptose neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Parkinson oder der Morbus Alzheimer genannt [108] oder für ein Versagen der Apoptose die Entstehung von Krebs [224]. Daher steht Apoptose seit einigen Jahren zunehmend im Interesse der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung und man erhofft sich, durch Modulation der apoptotischen Signalwege neue attraktive Therapiekonzepte erschließen zu können.

1.1.2.2 Molekulare Grundlagen und Signalwege der Apoptose

Die molekularen Vorgänge der Apoptose sind evolutionär stark konserviert. Man gewann erste Erkenntnisse über die genetischen Hintergründe der Apoptose durch Studium des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, in dessen Entwicklung 131 der 1090 somatischen Zellen durch Apoptose eliminiert werden [187]. Die dafür wesentlichen Genprodukte sind CED-3, CED-4 und CED-9. Bei Wirbeltieren finden sich in der apoptotischen Signalkaskade wiederum Proteine, die denen von *C. elegans* ähneln: Caspasen entsprechen CED-3 [193], Apaf-1 ist homolog zu CED-4 [225] und die Produkte der Bcl-2-Genfamilie erinnern an das Protein CED-9 [215].

Eine besondere Gruppe von Molekülen, Cystein-Proteasen, die als sog. Caspasen (cystein aspartat specific proteases) [4] bezeichnet werden, sind von herausragender Bedeutung für die Ausführung des programmierten Zelltods. Ihre kurze Beschreibung soll der Darstellung der apoptotischen Signalwege vorangestellt werden:

Caspasen:

Caspasen finden sich in allen zur Apoptose fähigen Organismen [35, 51]. Mindestens 14 Mitglieder der Caspasen-Familie sind bisher in Säugetieren identifiziert worden, 10 davon finden sich auch beim Menschen. Caspasen werden als Zymogene synthetisiert, die eine sehr niedrige intrinsische Enzymaktivität besitzen. Der aktiven Enzymform entspricht ein Heterotetramer, das sich aus je zwei identischen Untereinheiten von ~20 kDa bzw. ~10 kDa zusammensetzt und zwei katalytische Zentren besitzt [51]. Man kann Caspasen entsprechend ihrer Funktion und ihrer Stellung innerhalb der apoptotischen Signalprozesse in die sog. Initiatorcaspasen (Caspase 8, 9, 10, 2), deren Aufgabe die Weiterleitung und Verstärkung des Apoptosesignals ist, und die sog. Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7), die den Zelluntergang durch Abbau zellulärer Proteine besiegeln, unterteilen (siehe **Abbildung 2**). Die Aktivierung der Caspasen kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Die eine Möglichkeit besteht in einer Autoaktivierung der Procaspasen durch induzierte Nähe, da die minimale Eigenaktivität eines Moleküls der Enzymvorstufe ausreicht, um ein anderes Molekül zu schneiden und damit zu aktivieren [91, 139]. Das so freigesetzte, voll funktionsfähige Enzym kann in der Folge weitere Procaspasen schneiden und eine kaskadenartige Aktivierung anderer

Caspasen einleiten. Diese Aktivierung einer Procaspase durch ein bereits kompetentes Enzym ist der zweite Weg der Caspaseaktivierung. Er dient der Amplifizierung eines apoptotischen Signals, die schließlich in der Aktivierung der Effektorcaspasen resultiert. Die dritte Möglichkeit ist die Aktivierung durch Assoziation mit einer regulatorischen Untereinheit, beispielsweise eines Adapterproteins wie Apaf-1 [225, 226]. Sie spielt z.B. beim mitochondrialen Signalweg der Apoptose eine Rolle und wird weiter unten beschrieben.

Grundprinzip der Signalgebung ist die Aktivierung einiger weniger am Anfang der Kaskade (upstream) liegenden Caspasen und die konsekutive lawinenartige Rekrutierung nachgeordneter (downstream) Caspasen, die als Effektorcaspasen zelluläre Proteine schneiden und damit entweder aktivieren oder inaktivieren (siehe **Abbildung 2**).

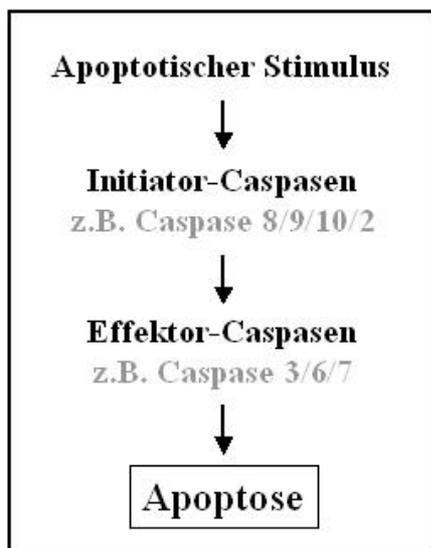


Abbildung 2: Grundprinzip der Caspasevermittelten apoptotischen Signalgebung

Die differenzierte Wirkung der Effektorcaspasen sei hier am Beispiel des Schicksals der DNA kurz skizziert: Caspasen inaktivieren das DNA-Reparaturenzym „Poly-ADP-Ribose-Polmerase“ (PARP). Damit erleichtern sie den DNA-Abbau und sparen Energie für den aktiven Apoptoseprozess [190]. Gleichzeitig aktivieren sie die sog. „caspase-activated DNase“ (CAD), die normalerweise durch den Inhibitor iCAD inaktiviert ist. Sie wird über Spaltung von iCAD durch Caspasen freigesetzt und führt dann die für die Apoptose charakteristische Spaltung der DNA aus [53, 125, 168].

Die Substrate der Caspasen sind vielfältig und reichen von den Caspasen selbst über Strukturproteine wie Lamin und Aktin bis zu den Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie.

Es sind mittlerweile eine Vielzahl von Proteinen identifiziert worden, die sich an den Signalprozessen der Apoptose beteiligen. Obwohl man das sensible Zusammenspiel der einzelnen Faktoren noch nicht in seiner Gesamtheit verstanden hat, so haben sich doch zwei grundsätzliche Signalwege herauskristallisiert: Der über Todesrezeptoren vermittelte, extrinsische und der über Beteiligung der Mitochondrien vermittelte, intrinsische Signalweg (siehe **Abbildung 4**). Erstgenannter wird klassischerweise über Bindung eines Liganden an der Außenseite der Zellmembran und Oligomerisierung der beteiligten Rezeptoren aktiviert, während der mitochondriale Signalweg durch eine Reihe intrazellulärer Stressantworten getriggert wird. Diese beiden Wege schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus, vielmehr existieren zahlreiche Querverbindungen, um apoptotische Signale zu potenzieren und den Untergang der Zelle zu sichern.

Der Rezeptor-vermittelte (extrinsische) Signalweg:

Ausgangspunkt des extrinsischen Signalwegs sind die sog. Todesrezeptoren der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie. Ihnen werden derzeit 6 verschiedene Rezeptoren zugerechnet, von denen Fas/CD95, dem TNF- α -Rezeptor 1 und den TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)-Rezeptoren 1 (DR4) und 2 (DR5) sowohl eine physiologische als auch eine pathophysiologische Bedeutung beigemessen werden. Todesrezeptoren sind Typ-1-Transmembranproteine mit einer extrazellulär lokalisierten N-terminalen Domäne, die für das Binden der Liganden verantwortlich ist, einem membranüberspannenden Teil und einem C-terminalen Schwanz. An diesem befindet sich eine 60–80 bp lange Aminosäuresequenz, die innerhalb der Gruppe der Todesrezeptoren sehr ähnlich ist und als sog. death domain (DD) bekannt ist.

Die Signalgebung aller Todesrezeptoren läuft nach dem gleichen Muster ab: Das Binden des entsprechenden Liganden (FasL, TNF- α , TRAIL) führt zur Oligomerisierung der Rezeptormoleküle. Dadurch wird das Signal ins Zellinnere weitergeleitet und es kommt zur Anlagerung des Adapterproteins „Fas associated death domain protein“ (FADD). Dies geschieht über homotypische Interaktion der jeweiligen DD von Rezeptor einerseits und FADD andererseits. FADD wiederum besitzt eine sog. „death effector domain“ (DED), die über Assoziation mit einer entsprechenden DED in der Prodomäne der inaktiven Initiatorcaspasen 8 und 10 die Rekrutierung dieser Caspasen bewirkt [99, 208]. Der dabei entstehende Komplex

wird „death inducing signaling complex“ (DISC) genannt. In ihm kommt es zur autokatalytischen Spaltung beispielsweise der Procaspase 8 zur aktiven Caspase 8. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen eröffnet schließlich die Serie der proteolytischen Vorgänge, die den apoptotischen Zelltod charakterisieren. Die Signalvermittlung über Fas und TRAIL-R1 und R2 folgt prinzipiell den oben dargestellten Prozessen.

Der extrinsische Signalweg kann auf der Ebene der Bildung des DISC durch eine Familie von Proteinen mit dem Namen „FLICE-inhibitory proteins“ (c-FLIP) reguliert werden. c-FLIP entfalten antiapoptotische Eigenschaften zum einen über eine Verhinderung der Ausbildung des DISC durch kompetitive Hemmung der Anlagerung der Procaspase 8. Zum anderen sind sie in der Lage, die proteolytische Aktivierung der Caspase 8 zu blockieren [110].

Die Signalvermittlung über TNF-R1 weist eine Besonderheit auf. Sie beinhaltet proapoptotische Signale und Überlebenssignale [206]. Nach Bindung von TNF- α kann sich das Adapterprotein „TNFR-associated protein with death domain“ (TRADD) anlagern. TRADD wiederum rekrutiert mehrere Signalmoleküle, beispielsweise FADD, „TNF-associated factor-2“ (TRAF-2), „receptor-interacting protein“ (RIP) und „RIP-associated ICH-1/CED-2-homologous protein with a death domain“ (RAIDD). FADD bindet und aktiviert Caspase 8/10 und leitet damit Apoptose ein. RIP bindet entweder RAIDD und rekrutiert damit Caspase 2 oder es assoziiert mit TRAF-2, was zur Aktivierung der „NF- κ B-inducing kinase“ (NIK) führt. Dies resultiert schließlich in der Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B, der mit der Vermittlung von Überlebenssignalen in der Zelle in Verbindung gebracht wird [205] (siehe **Kap. 1.1.2.3**).

Der mitochondriale (intrinsische) Signalweg:

Eine Reihe mitochondrialer Proteine können apoptotische Programme aktivieren [48, 74, 109, 119, 124, 188, 202]. Diese Proteine halten sich unter Normalbedingungen im Intermembranspalt der Mitochondrien auf. Apoptotische Stimuli, die entweder aus dem extrinsischen Signalweg stammen, z.B. vermittelt durch das Protein t-Bid, oder intrazellulär über andere Mechanismen generiert werden, führen zu einer Freisetzung der mitochondrialen Proteine in das Zytosol oder in den Zellkern. Zwei Ereignisse auf der Ebene der Mitochondrien scheinen dabei von Bedeutung zu sein. Die Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran, hervorgerufen durch den

Zusammenbruch des Membranpotentials $\Delta\Psi$ (ca. -220 mV), und die Permeabilitätsänderung (permeability transition, PT) der inneren Membran [109, 129]. Sie beschreibt die Öffnung von normalerweise kontrollierten, komplexen Kanälen mit dem Namen „permeability transition pore“ (PTP) an den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Membran [20, 39]. Es kommt zum Durchtritt kleiner (< 1500 Da) Moleküle durch die innere Membran mit konsekutivem Anschwellen der mitochondrialen Matrix und Ruptur der äußeren Membran [130]. Die freigesetzten Moleküle treiben daraufhin die Apoptose voran, z.B. durch Aktivierung von Caspasen und Nukleasen oder durch Neutralisierung zytosolischer Inhibitoren des programmierten Zelltods. Dabei entsteht ein komplexes Bild der Interaktion pro- und antiapoptotischer Proteine. Einige Charakteristika sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden:

Cytochrom c, ein Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, bindet nach seiner Freisetzung aus dem intermembranären Spalt an das Adaptermolekül Apaf-1 (apoptotic protein activating factor-1), welches daraufhin seine „caspase activation and recruitment domain“ (CARD) exponiert. Die CARD bindet nun wiederum die Procaspase 9. Durch Oligomerisierung zu einem Heptamer entsteht ein Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird [226]. Darin liegt die Caspase 9 nun als aktives Enzym vor und schneidet weitere Caspasen wie z.B. die Effektorcaspase 3 [164, 225]. Aber auch noch weitere Proteine unterstützen die Apoptose, z.B. Smac/DIABLO, indem es mit den sog. „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP) interagiert und sie an der Hemmung aktiver Caspasen hindert [48, 202]. Daneben scheint es aber auch noch Caspasen-unabhängige Reaktionswege der Apoptose zu geben. Zwei Beispiele hierfür sind AIF und EndoG [90]. Der sog. „apoptosis inducing factor“ (AIF) transloziert nach seiner Freisetzung aus dem Mitochondrium zum Zellkern. Dort führt er unabhängig von einer Aktivierung der Caspasen zu Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung [133, 188]. Ein ähnlicher Mechanismus ist für die Endonuklease G (EndoG) beschrieben worden [119, 194, 209].

Nach Aktivierung des mitochondrialen Signalweges greifen also vielfältige apoptotische Mechanismen ineinander, die in ihrer Gesamtheit derzeit noch nicht verstanden sind. Sie münden in einer Caspase-abhängigen oder -unabhängigen Weise in einem gemeinsamen Endpunkt: Dem Untergang der Zelle.

Bcl-2-Proteine:

Die Schwelle für die Ausführung des apoptotischen Programms unterliegt feinen Regulationsmechanismen, die besonders von Mitgliedern der sog. Bcl-2 Proteinfamilie kontrolliert werden. Diese zeichnen sich durch eine Sequenzhomologie im Bereich der sog. „Bcl-2 homology“ (BH)-Domänen aus. Mittlerweile sind viele solcher Bcl-2 Proteine beschrieben worden [65, 142]. Sie können sowohl antiapoptotisch sein (Bcl-2, Bcl-x_L (long), Bcl-w, A1, Mcl-1, Bfl-1, Brag-1, NR-13) als auch proapoptotisch (Bcl-x_S (short), Bax, Bad, Bak, Bid, Bik, Hrk) [1]. Die differenzierte Wirkung der Bcl-2 Proteine hängt aber auch von weiteren Faktoren wie z.B. Zelltyp, apoptotischem Stimulus, Umgebung der Zelle (z.B. An- oder Abwesenheit von Wachstumsfaktoren) ab. Antiapoptotische Bcl-2 Proteine können ihre proapoptotischen Verwandten hemmen und den Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien inhibieren [103]. Viele Einflussfaktoren scheinen eine Rolle zu spielen, und obwohl die exakten Mechanismen der Apoptoseregulation durch die Bcl-2 Proteine noch nicht vollständig aufgeklärt sind, scheint doch das Gleichgewicht zwischen den verschiedenartigen Mitgliedern dieser Proteinfamilie letzten Endes das Schicksal einer Zelle zu bestimmen.

Inhibitoren der Apoptose:

Eine Klasse von Proteinen, die sog. „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP), können das apoptotische Programm in der Zelle inhibieren. XIAP, c-IAP1, c-IAP2 oder Survivin sind einige ihrer Vertreter [6, 49, 122]. Sie binden an aktive Caspase 3, Caspase 7 und Caspase 9 und inhibieren diese kompetitiv [45, 166]. Ihre Aufgabe ist vor allem die Neutralisierung zufällig aktivierter Caspasen, aber sie scheinen auch in der Vermittlung von Überlebenssignalen eine Rolle zu spielen (siehe **Kap. 1.1.2.3**). Damit jedoch Apoptose im erforderlichen Fall stattfinden kann, verfügt die Zelle über einen Mechanismus, die IAPs unschädlich zu machen. So gelangt nach Permeabilisierung der mitochondrialen Membran das Protein Smac/DIABLO ins Zytosol und kann dort die IAPs binden und inhibieren (siehe oben) [48, 202].

1.1.2.3 Apoptose in der Leberzelle und zelluläre Überlebenswege

Apoptose in Leberzellen:

Hinweise für Apoptose können bei einer Vielzahl von Lebererkrankungen beobachtet werden [160]. So sind z.B. apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) schon seit langem als charakteristische Merkmale histopathologischer Präparate der Leber bekannt. Sie werden dort als sog. „Councilman bodies“ beschrieben. Da normalerweise die phagozytotische Beseitigung der apoptotischen Körperchen ein Freisetzen der Zellinhaltsstoffe verhindert, sollte Apoptose weitgehend ohne inflammatorische Reaktion ablaufen. Für die Leber ergeben sich jedoch Hinweise, dass Apoptose möglicherweise doch nicht so still abläuft wie zunächst angenommen. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass nach hepatozellulärer Apoptose intrazelluläre Enzyme in der systemischen Zirkulation erscheinen. Darüber hinaus führt ein Übersteigen der phagozytotischen Beseitigungskapazität für apoptotische Zellen zu einem Verlust der Gewebearchitektur mit inflammatorischer Reaktion [55]. Daher könnte Apoptose möglicherweise auch primärer Ausgangspunkt von Veränderungen sein, die man vom Aspekt her eher auf nekrotische Prozesse zurückführen würde. Der gesamte Vorgang der Apoptose scheint schnell zu sein, wobei die Dauer zwischen Minuten und einigen Stunden variieren kann [61].

Die beiden fundamentalen Signalwege der Apoptose scheinen in Leberzellen gleichermaßen von Bedeutung zu sein: Die starke Expression von Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche könnte möglicherweise Ausdruck des evolutionären Drucks sein, hepatotrope Viren zu eliminieren, da sich Zellen des Immunsystems bei der Beseitigung virusinfizierter Zellen vorzugsweise der Todesrezeptoren bedienen. In Hepatozyten und Cholangiozyten ist der mitochondriale Signalweg allerdings für den vollständigen Ablauf der Apoptose unabdingbar. Man bezeichnet sie diesbezüglich als sog. Typ II-Zellen. Generell werden hinsichtlich der apoptotischen Signalgebung zwei Typen von Zellen unterschieden: In Typ I-Zellen führt ein apoptotisches Signal nach Bildung des DISC über Aktivierung von Caspase 8 rasch zur Aktivierung der Caspase 3. Dies geschieht in einer von den Mitochondrien unabhängigen Weise. Die Beteiligung des intrinsischen Signalwegs dient lediglich als Verstärker und ist für den vollständigen Zellabbau nicht erforderlich. Im Gegensatz dazu ist in den sog. Typ II-Zellen die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs von essentieller Bedeutung. Dies wird durch folgende Beobachtung unterstrichen: Fas führt zwar sowohl in Typ I-

als auch in Typ II-Zellen zu einer Aktivierung der Mitochondrien, jedoch kann eine Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bcl-x_L (siehe **Kap. 1.1.2.2**) nur in Typ II-Zellen die komplette Ausführung der Apoptose blockieren [1].

Überlebenssignalwege:

Hepatozyten scheinen über bestimmte Überlebenssignalwege zu verfügen, die sie gegen die toxische Wirkung der Substanzen, denen sie ausgesetzt sind, schützen. So sind sie z.B. resistent gegen die TNF-Rezeptor-vermittelte Apoptose, solange sie nicht durch Hemmung bestimmter Signalmediatoren sensibilisiert werden. Der Transkriptionsfaktor NF-κB hemmt dabei die apoptotische Antwort der Leberzellen nach Exposition gegenüber TNF-α und anderen apoptotischen Stimuli [7, 16, 140, 214]. Erst in jüngerer Zeit ist die NF-κB-Familie in den Blickpunkt der Apoptoseforschung gerückt. Ihre Rolle in der Regulation von Immunantwort und Akutphase-Prozessen [67] ist allerdings schon seit längerem bekannt. Derzeit sind 5 Mitglieder dieser Familie identifiziert, wobei die größte Bedeutung RelA (p65), NF-κB1 (p50) und NF-κB2 (p52) zukommt. Dimere, bestehend aus den Untereinheiten RelA und NF-κB1 bzw. NF-κB2, befinden sich primär im Zytoplasma, wo sie an die inhibitorischen Untereinheiten IκB gebunden sind und daher transkriptionell nicht aktiv werden können [11, 178]. Nach entsprechendem Stimulus folgen die NF-κB-vorgeschalteten Signale klassischerweise einem Arm der TNF-R-Signalgebung aus dem extrinsischen Apoptoseweg (siehe **Kap. 1.1.2.2**). In ihm interagiert TRADD mit den Adapterproteinen TRAF2 und RIP, die entweder die „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK) oder die „NF-κB-inducing kinase“ (NIK) rekrutieren. JNK wird eine Bedeutung als proapoptotischer Signalmediator zugeschrieben [92]. NIK aktiviert in der Folge bestimmte IκB-Kinasen, die wiederum das NF-κB inhibierende Protein IκB phosphorylieren. Dieses wird über Ubiquitinierung seinem Abbau durch Proteasomen zugeführt [145]. Der freigesetzte, aktive NF-κB-Komplex transloziert nun zum Zellkern, bindet dort an spezifische Bindungsstellen in der Promotorregion seiner Zielgene und aktiviert deren Transkription [141, 220]. Der Vorgang der NF-κB-Aktivierung kann innerhalb von Minuten ablaufen. Eine Vielzahl von Stimuli scheinen ihn auszulösen, unter ihnen inflammatorische Zytokine wie TNF-α und IL-1, T-Zell-Aktivatoren sowie Wachstums- und Stressfaktoren. Daher wurde die NF-κB-Signalgebung ursprünglich rein mit inflammatorischen Prozessen assoziiert. Zudem kann man beobachten, dass die Gene, die durch NF-κB reguliert werden, unter

anderem Zytokine, Zytokinrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsregulatoren [14, 67] kodieren. Zu den Genprodukten der NF- κ B-Signalgebung scheinen aber auch eine Vielzahl antiapoptotischer Proteine zu gehören [169]. Mögliche Vertreter mit direkter antiapoptotischer Wirkung sind TRAF1 und 2, c-IAP1 und 2, Bcl-2, die Bcl-2-Homologe A1/Bfl-1 und Bcl-x_L, IEX-1_L und A20 [15, 173, 207]. Ein weiterer protektiver Effekt von NF- κ B besteht vermutlich in der Hemmung des proapoptotischen JNK-Signalwegs [44, 192] (siehe **Abbildung 3**). Eine Hemmung von NF- κ B führte in Hepatozyten zu gesteigerter TNF-induzierter Apoptose. Als Ursache fand sich eine vermehrte Aktivierung von JNK und c-Jun sowie eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von AP-1, was vermutlich eine Hochregulation proapoptotischer Gene und Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs zur Folge hat [123]. Auf der anderen Seite scheint NF- κ B in Hepatozyten jedoch mitunter auch proapoptotische Signale vermitteln zu können, beispielsweise durch vermehrte Expression der proapoptotischen Proteine Bax und Bak als Reaktion auf eine Stimulation mit Zytokinen [173]. Allerdings spricht die Tatsache, dass eine NF- κ B-Hemmung Hepatozyten für Apoptose sensibilisiert, dafür, dass die Hochregulation der antiapoptotischen Proteine die der proapoptotischen überwiegt.

Neben der NF- κ B-Aktivierung scheinen auch noch andere antiapoptotische Signalwege zu existieren. So konnte gezeigt werden, dass Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI₃K) wichtig für das Überleben der Zelle sind. Neuere Studien sprechen dafür, dass dies möglicherweise über Akt, ein PI₃-Kinase-nachgeschaltetes Protein, geschieht [60, 94] (siehe **Abbildung 3**). Die Aktivierung des PI₃K/Akt-Signalwegs bewahrt die Zellen vor ihrem Untergang nach Exposition gegenüber einer Vielzahl von apoptotischen Stimuli [50]. Die entsprechenden Mechanismen für diesen Schutz sind noch nicht völlig aufgeklärt, aber sowohl die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Bad oder Caspase 9 als auch die Aktivierung von NF- κ B könnten durch PI₃K/Akt vermittelt werden [18, 34, 43, 95]. Weitere potentielle Überlebenssignale könnten möglicherweise in einer Hemmung des proapoptotischen JNK-Signalwegs [98] oder in einer gesteigerten Expression antiapoptotischer Proteine wie c-Flip [146] bestehen.

Darüber hinaus wurde kürzlich ein Überlebenssignalweg identifiziert, der sich der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) und der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) bedient [156] (siehe **Abbildung 3**).

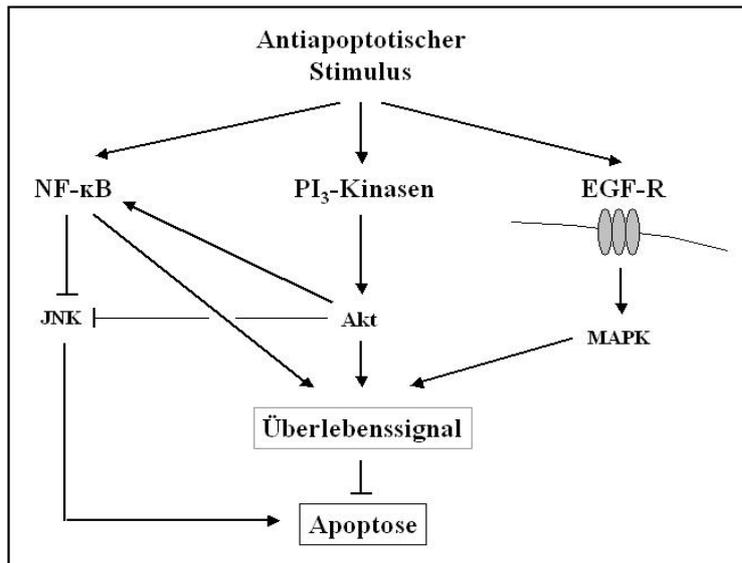


Abbildung 3:
Überlebenssignalwege im
Hepatozyten

1.1.2.4 Einfluss von Gallensäuren auf die hepatozelluläre Apoptose

Toxische hydrophobe Gallensäuren sind in der Lage Leberzellen zu schädigen, auch wenn sie weit unterhalb ihrer kritischen mizellären Konzentration vorliegen. Ihre Fähigkeit, Apoptose auslösen zu können, steht dabei im Vordergrund [17, 149, 163]. Das Ausmaß und die Progression der Leberschädigung ist bei cholestatischen Leberkrankheiten in erheblichem Umfang von dem Gleichgewicht zwischen toxischen und nichttoxischen Gallensäuren abhängig. Beim Menschen findet man Gallensäuren als Glycin- und Taurin-Konjugate, wobei erstere quantitativ im Verhältnis von ca. 3:1 überwiegen [83].

Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) stellt beim Menschen die quantitativ bedeutendste hydrophobe Dihydroxygallensäure dar und wird als hauptverantwortlich für Gallensäuren-induzierten Leberzellschaden bei Cholestase angesehen. GCDCA kann in Hepatozyten *in vitro* direkt Apoptose auslösen. Mehrere Mechanismen hierfür wurden bisher vorgeschlagen: So scheint GCDCA beispielsweise eine Aktivierung des membranständigen Fas-Rezeptors unabhängig von dessen Liganden zu induzieren [54]. Darüber hinaus werden Leberzellen möglicherweise für TRAIL-R2/DR5-vermittelte Apoptose sensibilisiert [80]. In der Folge bildet sich der DISC aus und führt zur Aktivierung von Caspase 8, gefolgt von einer direkten Rekrutierung der Effektorcaspasen und von Bid, das den mitochondrialen Signalweg aktiviert (siehe **Abbildung 4**). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass toxische Gallensäuren den

vesikulären Transport von Fas an die Zelloberfläche stimulieren, wobei PKC und JNK wichtige Signalmediatoren zu sein scheinen [69, 181]. Somit wird die Oligomerisierung und Aktivierung von Fas erleichtert. Auch im Rahmen der Bildung des DISC wurde eine modulierende Wirkung von Gallensäuren beobachtet. So sind sie beispielsweise in der Lage, die Rekrutierung von c-Flip an den DISC zu verhindern, wodurch eine vermehrte Aktivierung der Initiatorcaspasen möglich wird [81].

Ein anderes Konzept wurde von Schoemaker et al. vorgeschlagen: GCDCA induziert in ihren Untersuchungen Caspase 8-Aktivierung und Apoptose in einer von FADD unabhängigen Weise. Eine Inhibition von Caspase 8 hatte keinen Effekt auf die Aktivität der Caspase 3. Somit führten sie die Aktivierung von Caspase 8 auf postmitochondriale Mechanismen zurück [172]. In der Tat gibt es Hinweise für eine sekundäre Rekrutierung des extrinsischen Apoptosewegs nach vorausgehender Aktivierung der intrinsischen Signalgebung. Einen ihrer Mediatoren könnte die Caspase 6 darstellen, die dann die Initiatorcaspase 8 aktiviert [12, 37] (siehe **Abbildung 4**).

Die Ebene der Mitochondrien hat in jedem Fall eine Bedeutung für die Gallensäuren-vermittelte Apoptose, ob nun als Ort der Induktion oder der Verstärkung apoptotischer Signale: Eine direkte Toxizität für den mitochondrialen Stoffwechsel wurde in aus Hepatozyten isolierten Mitochondrien gezeigt [106]. Andere Studien legen nahe, dass die Behandlung von Zellen mit hydrophoben Gallensäuren zu mitochondrialer Dysfunktion mit einer gesteigerten Freisetzung von Cytochrom c führt, wobei Bax ein vorgeschalteter Mediator in diesem Prozess zu sein scheint [161]. Ein weiteres Konzept der Gallensäuren-vermittelten Aktivierung des programmierten Zelltods beruht auf der Beobachtung, dass hydrophobe Gallensäuren die Generierung toxischer reaktiver Sauerstoffmetabolite in den Mitochondrien induzieren [182]. Der oxidative Stress kann in der Folge die MPT triggern, worauf es zur Freisetzung der intramembranären proapoptotischen Faktoren kommt (siehe **Kap. 1.1.2.2**). Yerushalmi et al. konnten zeigen, dass schon relativ geringe Konzentrationen an Gallensäuren oxidativen Stress in Hepatozyten induzieren. Dabei korrelierte der Grad an Apoptose nahezu linear mit dem Ausmaß an oxidativem Stress [218].

Reinehr et al. schlugen kürzlich vor, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite (reactive oxygen species, ROS) zu einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors führt, die wiederum eine Tyrosin-Phosphorylierung und Aktivierung von Fas triggert, was

schließlich die Ausbildung des DISC und damit die Ausführung des apoptotischen Programms nach sich zieht [159].

Das früher angenommene Konzept, dass Gallensäuren entweder rein pro- oder ausschließlich antiapoptotisch seien, muss in jüngerer Zeit allerdings revidiert werden. Einige Gallensäuren aktivieren anscheinend nicht nur apoptotische Signale, sondern gleichzeitig auch bestimmte Überlebenssignale, wodurch die ihnen innewohnende Toxizität abgeschwächt wird (siehe **Abbildung 4**). So verursacht Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) *in vitro* nur in geringem Ausmaß Apoptose. Wird jedoch ein PI₃-Kinasen/NF-κB-abhängiger Überlebenssignalweg blockiert, so steigt die apoptotische Wirkung von TCDCA *in vitro* stark an [167].

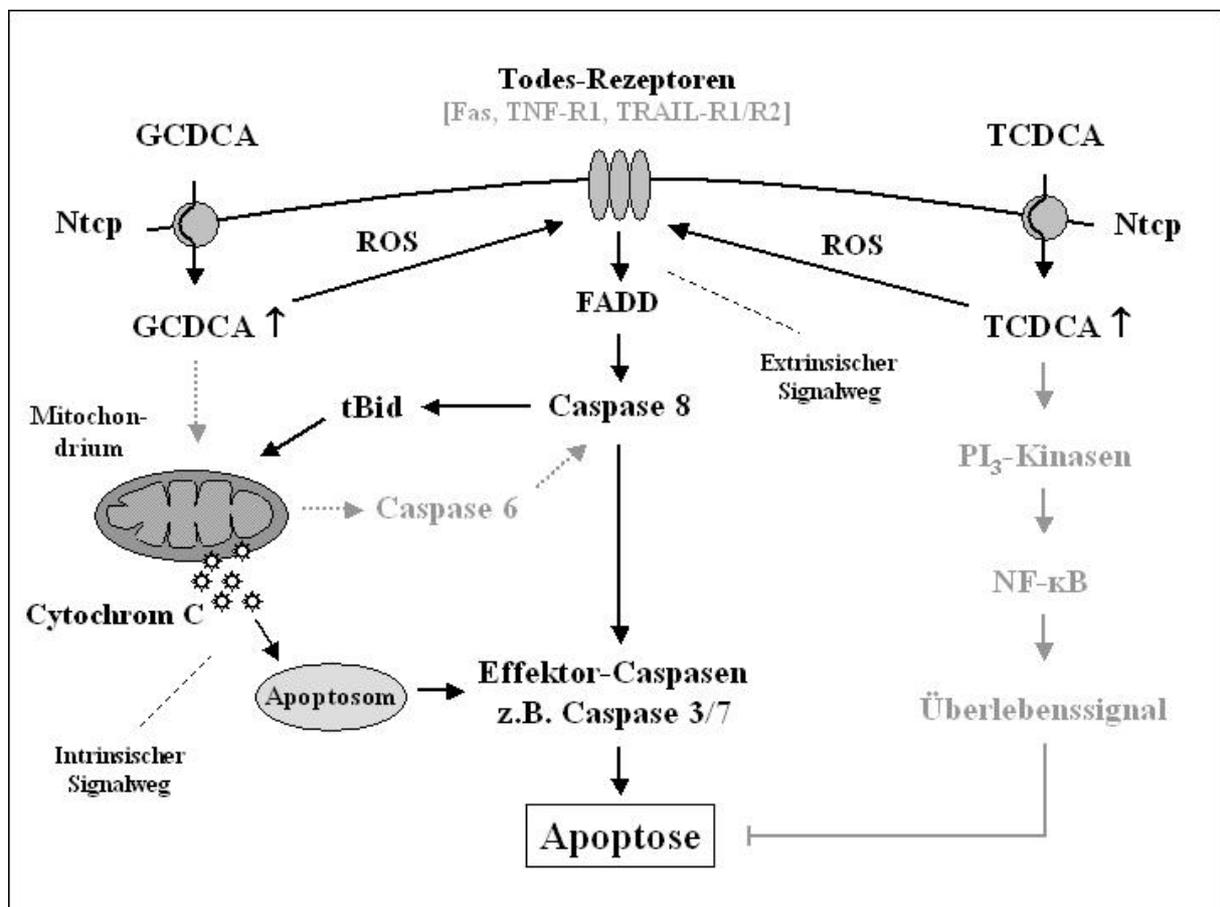


Abbildung 4: Modell des Einflusses hydrophober Gallensäuren auf die Apoptose in Leberzellen

Auch die hydrophile Gallensäure UDCA scheint Überlebenssignale zu aktivieren. An ihrer Vermittlung sind der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) und die mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) beteiligt [156]. Die gleichzeitige Gabe von

UDCA und einem MAPK-Inhibitor führte in Rattenhepatozyten zu einer Apoptoserate von mehr als 50 %. UDCA aktiviert wahrscheinlich also proapoptotische Signale und gleichzeitig starke MAPK-abhängige Überlebenssignale, die in ihrer Summe die letzten Endes nichttoxische Wirkung von UDCA erklären.

1.1.3 Phosphatidylinositol-3-Kinasen

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI₃-Kinasen) sind eine Gruppe von Enzymen, deren Aufgabe in der Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-Lipiden nach entsprechender Stimulation der Zelle besteht. Die entstehenden Mediatoren, z.B. Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P), Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃), spielen u.a. eine bedeutende Rolle in der Vermittlung von Wachstums-, Proliferations-, Migrations- und Überlebenssignalen [195]. Die Aktivierung der PI₃-Kinasen erfolgt z.B. über Tyrosinkinase [33] und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [185].

Es existieren mehrere Isoformen der PI₃-Kinasen. Man unterteilt drei Klassen, die jeweils bestimmte Substrate zu bevorzugen zu scheinen und damit unterschiedliche Signalwege innerhalb der Zelle unterhalten [200]. So sollen Klasse I_A-Enzyme die prädominante Rolle in sekretorischen Zellen spielen und beispielsweise hauptverantwortlich für die Antwort auf Wachstumsfaktoren sein [62]. Als Heterodimere bestehen sie aus einer regulatorischen (85 kDa) und einer katalytischen Untereinheit (110 kDa) [82]. Die regulatorische Untereinheit sorgt dafür, dass sich die katalytische Untereinheit in ruhenden Zellen in einem Stadium geringer Aktivität befindet. Die Aktivierung geschieht durch direkte Interaktion mit Phosphotyrosinresten der aktivierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder über Adapterproteine. Die so aktivierte PI₃-Kinase überführt schließlich Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat. Hieran können nun zahlreiche Mediatorproteine binden und die weitere intrazelluläre Signalgebung übernehmen [32].

Exemplarisch sollen hier die Proteinkinase Akt (auch Protein Kinase B, PKB) und Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PDK 1) genannt werden. Eine Assoziation mit PI(3,4,5)P₃ an der Membran bringt sie in räumliche Nähe zueinander und

erleichtert dadurch die Phosphorylierung von Akt durch PDK 1 [114]. Damit wird die katalytische Aktivität von Akt stimuliert, die wiederum andere Proteine der Zelle phosphoryliert. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist dabei die Vermittlung von Überlebenssignalen, die apoptotischen Programmen entgegenwirken können (siehe **Kap. 1.1.2.3**).

PI₃-Kinasen scheinen in Leberzellen darüber hinaus eine wichtige Rolle für transzellulären Vesikeltransport und Modulation zellulärer Transportproteine zu spielen [135]. Gallensäuren üben dabei möglicherweise einen modifizierenden Einfluss auf die entsprechenden Prozesse aus. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Taurocholsäure (TCA) über PI₃-Kinasen-abhängige Mechanismen choleretisch wirkt [134]. Ähnliches wurde für den choleretischen Effekt von TUDCA beschrieben [112]. Der anticholestatische Effekt von TUDCA scheint allerdings PI₃K-unabhängig zu sein [23]. Die hydrophobe Gallensäure TLCA hingegen scheint über PI₃-Kinasen einen cholestatischen Effekt zu vermitteln [23, 26]. Die Bedeutung der PI₃-Kinasen für die Vermittlung von Überlebenssignalen nach Gabe von TCDCA ist *in vitro* bereits belegt [167], *in vivo* existieren allerdings noch keine Untersuchungen ihres Einflusses auf die TCDCA-induzierte Modulation von hepatozellulärem Zellschaden und Transportprozessen.

Eine experimentelle Hemmung der PI₃-Kinasen kann durch den Einsatz bestimmter Inhibitoren erreicht werden, von denen sich Wortmannin als sehr zuverlässig bewährt hat: Wortmannin ist ein antifungal wirksames Antibiotikum, das aus *Penicillium fumiculosum* isoliert werden kann. Es ist leicht zellgängig und gilt als spezifischer und effektiver Inhibitor der PI₃-Kinasen [155], wobei eine direkte Interaktion mit der katalytischen Untereinheit gezeigt werden konnte [216]. Dabei reichen sehr niedrige Konzentrationen aus: IC₅₀-Werte für die Hemmung isolierter Enzyme befinden sich in einer Größenordnung von 1-10 nM, ähnliche Konzentrationen werden für die Hemmung der PI₃-Kinasen *in vivo* benötigt [62]. Wortmannin inhibiert irreversibel die p110-Untereinheit der Enzyme, wobei es kovalent an Lysin-802 bindet, einen Rest, der für die katalytische Aktivität benötigt wird und in allen Phosphatidylinositolkinasen konserviert ist [213].

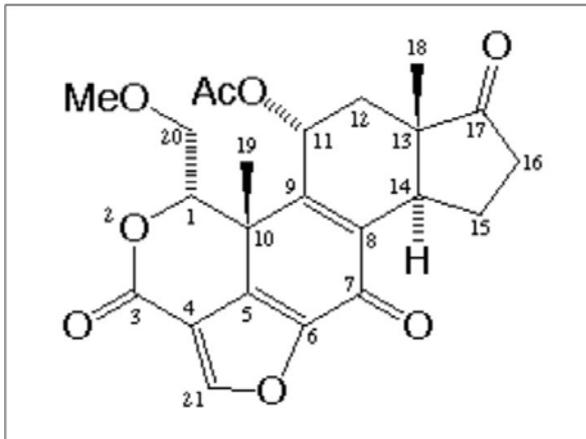


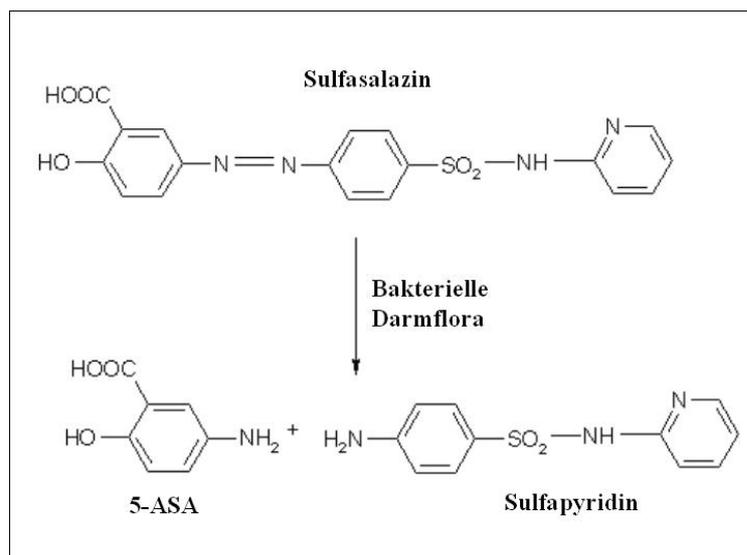
Abbildung 5: Molekulare Struktur von Wortmannin

1.1.4 Sulfasalazin als Modulator intrazellulärer Signaltransduktion

Sulfasalazin wurde erstmals 1941 von Svartz als Therapeutikum der rheumatoiden Arthritis eingeführt [189]. Es setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, deren unterschiedliche Wirkungsweise man synergistisch in einem Präparat nutzen wollte. Sulfapyridin, ein Sulfonamid mit antibiotischer Wirkung, und 5-Aminosalizylsäure (5-ASA), ein Salizylat mit antiinflammatorischer Potenz, bilden, verbunden über eine Azo-Bindung, das Gesamtmolekül Salazosulfapyridin (Sulfasalazin). Neben der Behandlung der rheumatoiden Arthritis findet Sulfasalazin auch in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen Anwendung.

Pharmakokinetik:

Das Medikament wird als magensaftresistente Filmtablette verabreicht, wodurch der Wirkstoff erst im oberen Dünndarmabschnitt freigesetzt wird. Ca. 30 % der Ausgangssubstanz werden im Jejunum absorbiert und gelangen nach enterohepatischer Zirkulation wieder nahezu unverändert in den oberen Dünndarm. Im Dickdarm wird Sulfasalazin durch die Azoreduktasen coliformer Bakterien in seine Einzelkomponenten 5-ASA und Sulfapyridin gespalten [86].

**Abbildung 6:****Spaltung von Sulfasalazin im Kolon**

Nach oraler Gabe von Sulfasalazin und Aufnahme im Gastrointestinaltrakt variiert der Anteil des Gesamtmoleküls, der die systemische Zirkulation erreicht, zwischen 2 % und 10 % [151, 174]. Es scheint in dieser Hinsicht keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Probanden, Patienten mit Colitis und Patienten mit Ileostoma zu geben [40, 41, 97, 175]. Nach Gabe einer täglichen Dosis von 4 g reichten die steady-state-Serumkonzentrationen von Sulfasalazin bei gesunden Probanden von 4,7 bis 45 µg/ml [174]. Sulfasalazin weist eine sehr hohe Plasmabindung an Albumin auf, wobei bei menschlichem Albumin drei entsprechende Bindungsstellen identifiziert wurden. In Konzentrationen von 44-125 µmol/l zeigt die Substanz bei pH 7,4 und 37 °C eine *in vitro*-Bindung von ca. 99 % [87]. Die Ausscheidung von Sulfasalazin erfolgt teilweise über die Niere, und nur Spuren der Substanz sind im Stuhl nachweisbar [41, 151, 174]. Im Rahmen der enterohepatischen Zirkulation von Sulfasalazin finden sich biliäre Konzentrationen, die den Serumspiegel 3- bis 10-fach übersteigen [97].

Sulfapyridin wird nach seiner Freisetzung aus Sulfasalazin nahezu komplett absorbiert und in der Leber einer Hydroxylierung, Glucuronidierung und N-Acetylierung zugeführt, wonach die entsprechenden Derivate gemeinsam mit einem geringen Rest an Sulfapyridin renal eliminiert werden. Der Acetyliererstatus der jeweiligen Person spielt eine wichtige Rolle für die Serumspiegel von Sulfapyridin [57, 175].

Nach Spaltung von Sulfasalazin durch die bakterielle Flora des Dickdarms findet sich ca. ein Drittel der Dosis der freigesetzten 5-Aminosalizylsäure im Urin wieder. Dabei erscheint 5-ASA nahezu komplett als acetylierter Metabolit (Ac-5-ASA). Nach Gabe

von Sulfasalazin scheinen die Serumkonzentrationen von unveränderter 5-ASA relativ niedrig zu liegen [40, 41, 57, 174], die Konzentrationen von Ac-5-ASA jedoch höher [57]. Dies deutet möglicherweise auf eine durch Azetylierung reduzierte Bioverfügbarkeit hin und in der Tat konnte im Rattenmodell ein entsprechender intestinaler und hepatischer first-pass-Effekt nachgewiesen werden [152]. Mindestens 50 % der intestinal zur Verfügung stehenden Menge an 5-ASA werden mit den Faeces ausgeschieden [151].

Wirkungsmechanismen:

Die Wirkungsmechanismen von Sulfasalazin sind noch weitgehend ungeklärt [64], doch es gibt mittlerweile ausreichend Hinweise darauf, dass dem Gesamtmolekül eine eigenständige Rolle in der Beeinflussung pathologischer Prozesse zukommt.

Die meisten therapeutischen Effekte von Salizylaten wie Sulfasalazin werden ihrem hemmenden Einfluss auf die Cyclooxygenasen und die Prostaglandinsynthese zugeschrieben. Ein weiterer interessanter und offenbar auch bedeutender Wirkmechanismus von Sulfasalazin besteht in der Modulation von Signaltransduktionswegen, die mit der Vermittlung apoptotischer Signale und entsprechend entgegengesetzten Überlebensstrategien der Zelle in Verbindung gebracht werden. So erwies sich Sulfasalazin als Aktivator von Apoptose in Lymphozyten und als spezifischer Inhibitor von NF- κ B [120, 203, 210].

Die molekularen Mechanismen der Sulfasalazin-induzierten Apoptose in T-Zellen sind von Liptay et al. charakterisiert worden: In ihrer Untersuchung führte Sulfasalazin zu einer Akkumulation von Bax und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$). In der Folge kam es zu einem Ausstrom von Cytochrom c und konsekutiver Aktivierung von Caspase 3. Die Gabe des Pancaspasen-Inhibitors ZVAD-FMK konnte den Untergang der Zellen jedoch nicht verhindern. Somit schien ein Caspase-unabhängiger Mechanismus entscheidend zu sein. In der Tat stimulierte Sulfasalazin die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien und seine Translokation zum Zellkern, welche die Fragmentierung der DNA und den Zelluntergang ermöglichte. Diese Vorgänge konnten durch Überexpression von Bcl-2 vollständig verhindert werden [121].

Die Effekte von Sulfasalazin auf die apoptotischen Signalprozesse in Leberzellen sind bisher noch völlig unbekannt.

1.2 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht am Modell Ntcp-transfizierter humaner HepG2-Zellen und der isoliert perfundierten Rattenleber Mechanismen der durch hydrophobe Gallensäuren ausgelösten Leberzellschädigung und deren Modulation durch Eingriff in die PI₃-Kinasen-Signalgebung und durch Sulfasalazin. Zusätzlich soll die Beeinflussung hepatobiliärer Transportmechanismen betrachtet werden.

In vitro-Untersuchungen beschreiben die Effekte von Sulfasalazin und seiner Spaltprodukte 5-Aminosalizylsäure (5-ASA) und Sulfapyridin auf die GCDCA-induzierte und die Gallensäuren-unabhängige Apoptose, die Gallensäureaufnahme in die Zellen sowie die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB.

In den Perfusions-Experimenten werden Effekte der hydrophoben Gallensäuren TCDCA und GCDCA und deren Modulation durch Einsatz von Sulfasalazin oder Gabe des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin verglichen. Als Zielparameter werden dabei dargestellt: Gallenfluss, biliäre Sekretion von 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion (GS-DNP) als Parameter der Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2, Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) als Indikatoren für das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung, aktivierte Caspase 3 und Zytokeratin 18-Filamentnetzwerk im Lebergewebe als Marker für die Apoptose, Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat als indirektes Maß für die Gallensäureaufnahme durch die Leber sowie Expression der aktivierten PKB als Maß der PI₃-Kinase-Aktivität im Lebergewebe.

Die beiden grundsätzlichen Fragestellungen sind:

I. Verändert ein Eingriff in die PI₃-Kinasen-vermittelte Signalgebung der Leberzelle die Toxizität hydrophober Gallensäuren in der intakten Leber? Welche Signalwege sind dabei von Bedeutung?

II. Besitzt Sulfasalazin in Leberzellen modulierenden Einfluss auf die Zellschädigung durch hydrophobe Gallensäuren? Welche Mechanismen spielen dabei eine Rolle?

2 METHODIK

2.1 Untersuchungen am Modell Ntcp-transfizierter HepG2-Zellen

2.1.1 Kultivierung der Zellen

Hep G2-Zellen (ATCC HB-8065) wurden in supplementiertem MEM (minimal essential medium, 10 % fötales Rinderserum, 1 % nichtessentielle Aminosäuren, 4 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B, pH 7,4, 37 °C, 5 % CO₂) angezchtet.

Ein Mediumwechsel erfolgte 2 x pro Woche, 1 x pro Woche wurde eine Zellpassage mit Trysin/EDTA-1x-Lösung (0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA, 0,85 g/l NaCl, pH 7-7,5) durchgeführt.

Eine ca. 90 prozentige Konfluenz der Zellen wurde am 2. Tag nach der Zellpassage erreicht und diente als Ausgangspunkt für die meisten Versuche.

2.1.2 Stabile Transfektion der humanen HepG2-Zellen mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt

Zur stabilen Transfektion mit Ratten-Ntcp wurden die Hep G2-Zellen auf 6-Well-Gewebekulturplatten aufgetragen. Nachdem die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % des Plattenbodens gewachsen waren, wurden sie mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt transfiziert. Das transfizierte Plasmid enthielt neben dem Gallensäuretransporter Ntcp auch ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Genitacin, sodass nach Kultivierung der Zellen in entsprechendem Antibiotikum eine Auslese zugunsten der erfolgreich transfizierten Zellen ermöglicht wurde.

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

Herstellung des Transfektionsgemisches: 100 µl Optimem + 5 µl Fugene-Reagens 5 min bei RT inkubiert, dann Zugabe von 2 µg der Plasmid-cDNA und weitere 15 min Inkubation bei RT.

100 µl Transfektionsgemisch wurden in jede Vertiefungen pipettiert. Nach 4-8 h erfolgte die Zugabe von 10 % FCS und Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut nach Zugabe von 500 µl/Vertiefung 1x Trysin/EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das gleiche Volumen an MEM zur Neutralisation zugegeben.

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

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

Isolierte Klone wurden in je einer Vertiefung einer 24 well-Platte ausgesät und mit 1 ml MEM und 1 mg/ml Geneticin G418 kultiviert. Dadurch wurde eine kontinuierliche Selektion zu Gunsten der effizient transfizierten Hep G2-Zellen erreicht.

Nachdem Zellen in 2 Vertiefungen konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen einer Vertiefung abtrypsiniert, abzentrifugiert und nach Resuspension des Rückstandes in Einfrierlösung (1,3 ml 90 % FCS, 10 % DMSO) weggefroren. Die andere Vertiefung wurde zur Durchführung eines Gallensäuren-Aufnahme-Assays verwendet (Durchführung siehe **Kap. 2.1.5**, S. 30). Dabei wurde die Aufnahmefähigkeit für Gallensäuren an den neu transfizierten Zellen und zur Kontrolle auch an nichttransfizierten Zellen untersucht.

Der letzten Endes für die Experimente verwendete Klon zeigte eine 140-fache Steigerung der Gallensäuren-Aufnahmefähigkeit.

2.1.3 Caspase 3/7 - Aktivitätsassay

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

Theorie:

Ein spezieller Lysepuffer permeabilisiert die kultivierten und präinkubierten Zellen, sodass die intrazellulär aktivierte Caspase 3 in das Medium freigesetzt wird. Dem Puffer wird das Caspase 3-Substrat Z-DEVD-R110 (Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspartatsäureamid)) beigefügt, welches vor dem Test als präfluoreszierende Substanz besteht. Als Folge der sequenziellen Spaltung und damit Entfernung der DEVD-Peptide durch die aktivierte Caspase 3 unter gleichzeitiger Anregung bei 499 nm, beginnt die Rhodamin 110-Gruppe intensiv zu fluoreszieren. Das Emissionsmaximum liegt bei 521 nm.

Die Menge der entstandenen fluoreszierenden Substanz ist proportional der Caspase 3-Aktivität in der Probe.

Durchführung:

Ntcp-transfizierte bzw. nicht transfizierte HepG2-Zellen wurde in Mehrfach-Kulturschalen mit 96 Vertiefungen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezchtet. Die Zellen wurden nach folgenden Versuchsbedingungen stimuliert und auf den Grad der Apoptose untersucht:

- Kontrollen
- TCDCA 25, 50 oder 75 μM
- GCDCA 25, 50 oder 75 μM
- GCDCA 75 μM + ZVAD-FMK 20 μM
- GCDCA 75 μM + SSZ / SPD / 5-ASA jeweils 1, 10, 100 oder 1000 μM
- TNF- α 28 ng/ml / Act.D 0,2 $\mu\text{g/ml}$ + SSZ 1, 10, 100 oder 1000 μM

Je nach Versuchsgruppe wurden 50 μl der entsprechenden Stimulationlösung in die einzelnen Vertiefungen pipettiert und die Zellen 4 Stunden lang inkubiert, anschließend einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und mit 50 μl serumfreiem Medium resupplementiert. Jeder Vertiefung wurden 50 μl des kommerziellen

Caspase 3/7-Testreagens beigefügt. Pro Versuchsgruppe wurden stets 3 verschiedene Vertiefungen verwendet. Die von uns gewertete Caspase 3-Aktivität entsprach dem Mittelwert der 3 Einzelmessungen. Bei jedem Versuch wurde eine „blank“ - Reihe (3 Vertiefungen ohne angelegten Zellrasen) und eine Reihe als Negativkontrolle (3 Vertiefungen, bei denen keine vorherige Stimulation der Zellen erfolgte) mitgeführt. Nach Zugabe des Testreagens wurden die 96 well-Platten lichtgeschützt eingepackt und auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur und einer Drehzahl von 300 rpm bis zum Ablesezeitpunkt durchgemischt.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach 2 Stunden in einem Fluorimeter (Zytofleur, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) bei einer Exzitationswellenlänge von 485 \pm 20 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 \pm 25 nm.

2.1.4 Darstellung aktivierter Caspase 3 in der Immunzytochemie

18 x 18 mm-Deckgläschen wurden 4 h in 1 M HCl-Lösung bei 55 °C vorbehandelt. Nach Spülen mit H₂O wurden sie 3 x 30 min in ein Ultraschallbad überführt. Anschließend wurden sie 30 min in 50 % Ethanol, weitere 30 min in 70 % und nochmals 30 min in 95 % Ethanol aufbewahrt. Je ein Deckgläschen wurde pro Vertiefung in eine Kulturschale mit 6 Vertiefungen eingesetzt.

Ntcp-tranfizierte HepG2-Zellen wurden auf den Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 80 % angezchtet. Anschließend erfolgte eine vierstündige Inkubation mit der Stimulationslösung (MEM + GCDCA 75 μ M, SSZ 1000 μ M oder GCDCA 75 μ M + SSZ in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M oder 1000 μ M) oder mit MEM ohne Zusätze als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und schließlich mit 3 % Formalin fixiert. Daraufhin wurde 3 x 5 min mit TBST (Tris-Base 50 mM, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1 %, pH 7,4) gespült und mit 5 % BSA in der Vertiefung für 1 h bei RT geblockt.

Die Deckgläschen wurden aus den Vertiefungen herausgenommen und mit einem Anti-cleaved-Caspase 3-Antikörper (1:50 in BSA) in einer Schale bei 4 °C für 24 h inkubiert. Nach 3 x 5 min Spülen mit TBST wurden die folgenden Schritte zum

Schutz der Fluoreszenz im Dunkeln geführt. Der Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper Alexa Flour wurde 1:200 in BSA auf die Deckgläschen aufgebracht und bei RT für 1 h belassen. Zusätzlich wurde der Kernfarbstoff Höchst 33342 in einer Verdünnung von 1:200 zu der Antikörper-Lösung hinzugefügt und mit dem 2. Antikörper inkubiert. Danach wurde 3 x 5 min mit TBST und 2 x 5 min mit Aqua dest. gespült. Schließlich wurden die Präparate mit Vectashield mounting medium auf Objektträgern eingedeckt und im Dunkeln aufbewahrt.

Die Betrachtung der Präparate erfolgte möglichst zeitnah unter einem Zeiss Axiovert 135 TV Mikroskop, als Kamera diente eine Zeiss AxioCam MRm. Die Bildbetrachtung am Computer und die Auszählung Caspase 3-positiver Zellen wurde mittels der Software Axiovision 3.1 durchgeführt (Zeiss, Oberkochen). Zur Aufnahme der Fluoreszenz-Signale wurde für den Kernfarbstoff mit 445/50 nm und für die aktivierte Caspase 3 mit 530/50 nm angeregt.

Die Auszählung der Gesamtzellzahl (anhand des Kernfarbstoffs) und der apoptotischen Zellen (anhand der Caspase 3-Färbung) erfolgte geblindet durch 3 verschiedene Untersucher. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt.

2.1.5 Bestimmung der [³H]-Taurocholsäure-Aufnahme

Die Aufnahmefähigkeit der Zellen wurde mit Hilfe der mit dem radioaktiven Isotop [³H] markierten Gallensäure Taurocholsäure untersucht.

Nichttransfizierte oder Ntcp-transfizierte Zellen wurden in Mehrfach-Kulturschalen mit 6 Vertiefungen bis zu etwa 90 prozentiger Konfluenz angezüchtet. Nach kurzem Waschen mit MEM ohne Zusätze wurden die Zellen 1 h bei 37 °C mit der Stimulationslösung (MEM + SSZ, 5-ASA oder SPD in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M oder 1000 μ M) oder mit MEM ohne Zusätze als Kontrolle inkubiert. Nach Abpipettieren des Stimulationsmediums wurden die Zellen 3 x mit einer Pufferlösung (100 mmol/l NaCl, 2 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 5,5 mmol/l D-Glucose, 10 mmol/l N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N-[2-Ethansulfonsäure]; pH 7,5; 37 °C) gewaschen.

Puffer-Lösungen:

Stop-Puffer: 53,7 mg Na-Taurocholat (537 g/mol) ad 100 ml Aufnahme-Puffer (1 mmol/l TCA)

10 $\mu\text{mol/l}$ [^3H]-Taurocholat (1 $\mu\text{Ci/ml}$): 100 μl Stop-Puffer (1 mmol/l TCA), 10 μl [^3H]-Taurocholat (250 $\mu\text{Ci}/250 \mu\text{l}$, 3,00 Ci/mmol) ad 9,89 ml Aufnahme-Puffer

Es erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 10 $\mu\text{mol/l}$ [^3H]-Taurocholat pro well und eine Inkubation bei 37 °C für 20 min. Anschließend wurde der [^3H]-Taurocholat-Puffer abgezogen und die Zellen wurden 3 x mit je 1 ml eiskaltem Stop-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 0,5 ml 1 % Triton X-100 wurden die Zellen bei RT geschüttelt, bis sie lysiert waren (ca. 10 min).

100 μl des Ansatzes wurden entfernt, 1:500 verdünnt und einer Proteinbestimmung nach Bradford [30] zugeführt.

Aliquots von je 400 μl wurden in 10 ml Szintillations-Cocktail gelöst. Die Radioaktivität wurde mittels eines Packard Tri-Carb 2100 Szintillationsmessgeräts für Flüssigkeiten (Packard Instrument Co., Frankfurt/Main) gemessen. Die erhaltenen Werte wurde auf den parallel bestimmten Proteingehalt normalisiert.

2.1.6 NF- κB - Luciferase-Reporterergen-Assay

Hepatozyten wurden mit 1 μg des konstitutionell aktiven *Renilla* Plasmids TK-*Ren*-CMV und 2 μg des *Firefly*-Luciferase-Plasmids ConA- κB (p106) in Mehrfach-Kulturplatten mit 6 Vertiefungen transient kotransfiziert. Das TK-*Ren*-CMV Plasmid wurde kommerziell erworben (Promega, Madison, WI, USA), das ConA-luc Plasmid mit der κB -Region (p106) wurde freundlicherweise von Prof. Paya (Rochester, MN, USA) zur Verfügung gestellt. Die Transfektion der Hepatozyten wurde mit Fugene von Roche durchgeführt (analog zum Transfektionsprotokoll auf S. 26).

Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde der Luciferase-Reporterergen-Assay durchgeführt. Sowohl die *Firefly* als auch die *Renilla* Luciferase-Aktivität wurden mit dem „Dual-luciferase Reporter Assay System“ von Promega gemäß den Angaben des Herstellers gemessen. Da die *Renilla*-Aktivität proportional zur Transfektionsrate

ist, konnte die *Firefly*-Aktivität in einem Arbeitsgang zur Transfektionsrate normalisiert werden und ermöglichte somit eine Berechnung der NF- κ B-Aktivierung.

Das Transfektionsmedium wurde abgesaugt, die Zellen wurden 1 x mit Medium ohne Zusatz gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Stimulationsmedium (MEM mit GCDCA 75 μ M, SSZ 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M, bzw. GCDCA 75 μ M + SSZ in entsprechenden Konzentrationen, oder TNF- α 50 ng als Positivkontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und nach Zugabe des Lysispuffers PLB (im Kit enthalten) für 15 min bei 500 rpm inkubiert. Danach wurden sie (abweichend vom Protokoll des Herstellers) 1 x bei -20 °C weggefroren und erneut aufgetaut, um den Lysevorgang zu unterstützen.

10 μ l Probe wurden zu 50 μ l LAR2-Substrat (für die Firefly-Luciferase) eingesetzt, und das Signal der Firefly-Luciferase wurde im Luminometer (TD 20/20, Software Turner Design Version 2.0.1, Turner Designs Inc., Sunnyvale, CA) abgelesen. Nach Zugabe von 50 μ l Stop-and-glow-Lösung (enthält das Substrat für Renilla-Luciferase und einen Puffer, der die Firefly-Luciferase unterdrückt) wurde das Signal der Renilla-Luciferase im Luminometer abgelesen.

Die aus beiden Werten gebildete Ratio lieferte das Maß für die Aktivierung von NF- κ B (ausgedrückt in RLU = relative light units).

2.2 Untersuchungen am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber ist ein etabliertes System zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in der intakten Leber [25, 204].

2.2.1 Technik der isolierten Rattenleberperfusion

Die Anästhesie der Ratten erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos). Nach Eröffnung der linken Leistenregion wurde eine Inguinalvene punktiert und 0,1 ml Heparin (Heparin-Natrium Braun 25.000 I.E./ml, Braun, Melsungen) im Bolus injiziert.

Die Bauchdecke wurde bis zum Processus xiphoideus hin mittels Medianschnitt eröffnet. Dieser wurde im Unterbauchbereich beidseitig nach lateral erweitert. Daraufhin wurden die Baucheingeweide nach links verlagert, um besseren Zugang zur Leberpforte zu erlangen. Anschließend erfolgte die Anlage eines Ligaturfadens (Baumwolle, Stärke 50) um die Vena cava inferior oberhalb des Zuflusses der rechten Vena renalis. Es folgten zwei Ligaturen der Vena portae in ihrem pankreatoduodenalen Anteil. Distal wurde dieser Pfortaderast mittels einer Mikroschere eröffnet und umgehend mit einer 16G-Venenverweilkanüle (Insyte-W[®] von Becton Dickinson, Sandy, Ut., USA) kanüliert. Zur Fixierung wurden die beiden Ligaturen zugezogen und verknotet. Das Einführen der Kanüle, die über einen mit der Perfusionsanlage verbundenen Kunststoffschlauch für den Zustrom der Perfusionslösung sorgte, markierte den Beginn der isolierten Leberperfusion und damit auch den Start der Zeitmessung. Zur Vermeidung einer Drucküberlastung der Leber und zur Sicherstellung eines ungehinderten Abflusses des Perfusats wurde unmittelbar nach Perfusionsbeginn die Vena cava inferior unterhalb der vorher platzierten Ligatur durchtrennt.

Danach wurde mittels Thorakotomie das Herz der Ratte freigelegt. Es wurden zwei Ligaturen am intrathorakalen Teil der Vena cava inferior angelegt. Nach Eröffnung des rechten Vorhofs mittels Mikroschere wurde eine 16 G-Venenverweilkanüle

retrograd in die Vena cava inferior eingeführt und mittels Zuziehen und Verknoten der beiden Ligaturen gesichert. Ein Kunststoffschlauch stellte den kontrollierten Abfluss des Perfusats sicher.

Daraufhin wurde der Gallengang aufgesucht, mittels zweier Pinzetten stumpf freipräpariert und nach Eröffnung durch eine Mikroschere mit einem Polyethylenschlauch (Innendurchmesser 0,40 mm, Außendurchmesser 0,80 mm, SIMS Portex Ltd., Hythe, Kent, Großbritannien) kanüliert. Dieser wurde mit einer Ligatur gesichert und so positioniert, dass ein einwandfreier Abfluss der Galle und eine optimale Erreichbarkeit des distalen Endes zum Auffangen der Gallenflüssigkeit gewährleistet waren.

Im Anschluss wurde die Ligatur der infrahepatischen Vena cava verschlossen, woraufhin die Drainage des Perfusats exklusiv über die Kanüle im intrathorakalen Teil der unteren Hohlvene erfolgte. Die Platzierung einer Temperatursonde zwischen den Leberlappen ermöglichte eine kontinuierliche Messung der Temperatur der Leber. Anschließend wurde die Leber mit einer kleinen Kappe aus Aluminiumfolie abgedeckt, um ein eventuelles Abkühlen der Leberoberfläche zu minimieren.

Als Perfusionsmedium diente Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 1,9 mM CaCl₂, 5,5 mM D-Glucose, pH 7,4). Der Puffer wurde mittels einer Schlauchpumpe (MS-1 Reglo 160/6, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld) in konstanter Geschwindigkeit gefördert, sodass eine gleichmäßige Perfusionsrate von 40 ml/min gewährleistet war. In einem Wasserbad wurde das Medium auf 37 °C erwärmt und über einen Oxygenator mit Carbogen[®] (95 % O₂, 5 % CO₂, Linde, Höllriegelskreuth) begast. Mit Hilfe von Perfusorpumpen (Perfusor[®], Braun, Melsungen) konnte über ein Mehrwegehahnsystem die Zufuhr von Gallensäuren, Wortmannin, Sulfasalazin und Trägerlösungen erfolgen. Eine der Perfusionskanüle vorgeschaltete Blasenfalle verhinderte das Eindringen kleiner Luftbläschen in die Pfortader. Die kontinuierliche Messung des portalvenösen Drucks (in cm Wassersäule) wurde mittels skaliertes Glasröhre vor dem zuführenden Schlauch durchgeführt (siehe **Abbildung 7**).

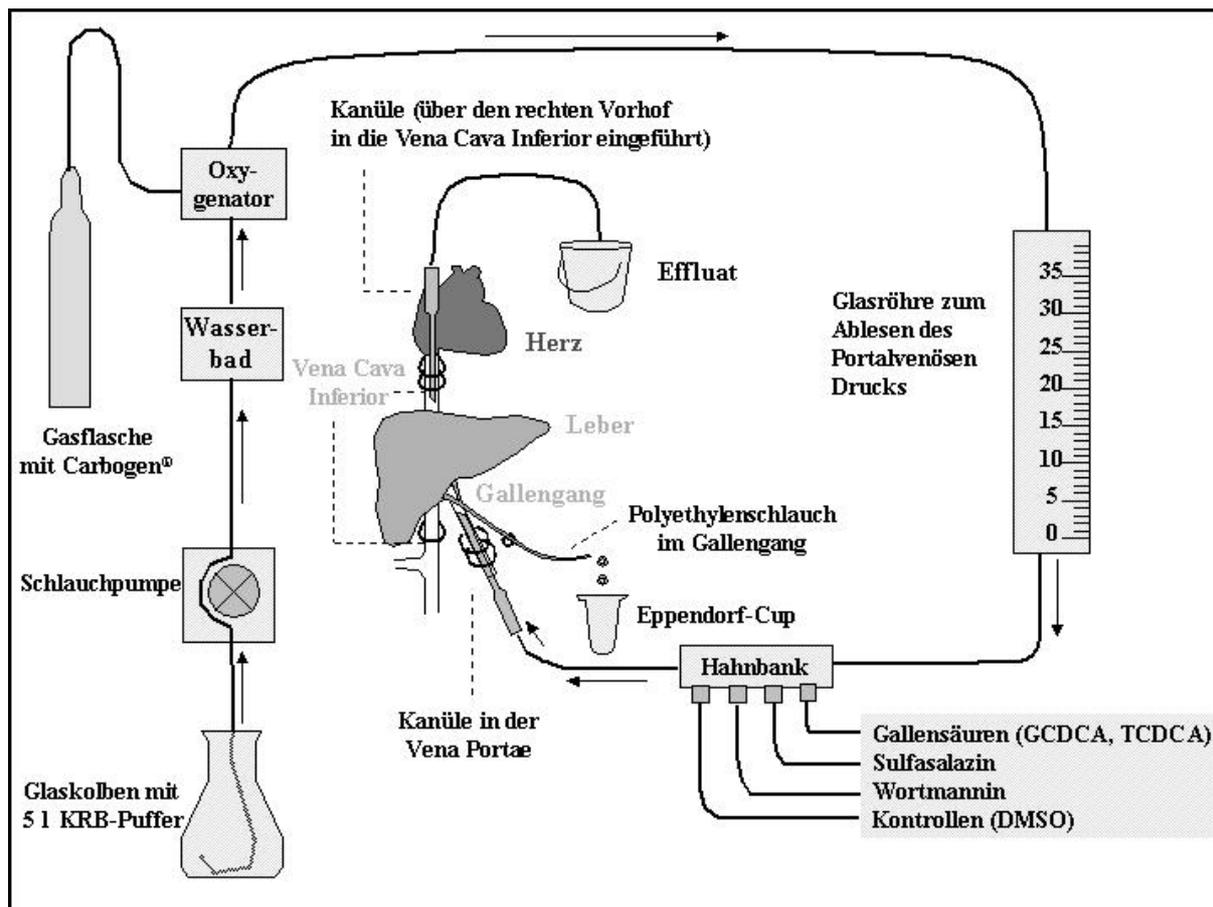


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Perfusionsanlage

2.2.2 Versuchsprotokoll der Perfusion

Die Rattenlebern wurden ab dem Startpunkt der Zeitmessung bis zur 90. min kontinuierlich mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Perfusionsrate betrug dabei konstant 40 ml/min. Ab der 21. min erfolgte je nach Versuchsvariante die Zugabe von Sulfasalazin (100 $\mu\text{mol/l}$), dem PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin (100 nmol/l), von beiden Substanzen zusammen (Sulfasalazin 100 $\mu\text{mol/l}$ + Wortmannin 100 nmol/l) oder zur Kontrolle deren Trägersubstanz DMSO (0,001 %, v/v). Von der 31. min an wurden die Gallensäuren TCDCA (25 $\mu\text{mol/l}$), GCDCA (25 $\mu\text{mol/l}$, 12,5 $\mu\text{mol/l}$) oder als Kontrolle deren Träger DMSO (0,1 %, v/v) appliziert. Folgende Versuchsbedingungen wurden untersucht:

Gruppe	Wortmannin (100 nM)	Sulfasalazin (100 µM)	Gallensäuren (ab 31. Min)		
			TCDCa (25 µM)	GCDCA (25 µM)	GCDCA (12,5 µM)
A					
B	+				
C		+			
D	+	+			
E			+		
F	+		+		
G				+	
H	+			+	
I		+		+	
J	+	+		+	
K					+
L	+				+
M		+			+

Tabelle 1: Versuchsvarianten

(mit „+“ markierte Substanzen wurden im jeweiligen Versuch eingesetzt)

Zwischen der 41. und 50. min erfolgte die zusätzliche Infusion des organischen Modellansions 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB, 30 µmol/l). Die im Anschluss an die Perfusion durchgeführte spektrophotometrische Quantifizierung des entstandenen Biotransformationsproduktes GS-DNP in der gesammelten Galle ermöglichte eine Aussage über die Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 (siehe **Kap. 2.2.3**).

Ab der 16. min wurde die aus der Gallengangskanüle austretende Gallenflüssigkeit in vorgewogenen Eppendorf-Cups über jeweils 5 min gesammelt und gravimetrisch quantifiziert. Anschließend wurden die Cups auf Eis gelagert. Es wurde ein spezifisches Gewicht der Gallenflüssigkeit von 1,0 g/ml angenommen. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Perfusionen wurde der Gallenfluss jeweils in µl Gallenflüssigkeit/(g Leber x min) dargestellt.

Jeweils zur 25., 45., 65. und 85. min wurden Proben des venösen Leber-Effluats gesammelt und auf Eis gelagert. Hieraus erfolgte die Bestimmung der Aktivität der Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), um eine Aussage über einen eventuell bestehenden Leberzellschaden und dessen Entwicklung über die Zeit machen zu können. Eine Bestimmung der Gallensäurenkonzentration in diesen Perfusatproben ermöglichte eine Abschätzung der vorhergehenden Gallensäureaufnahme durch die Leberzellen.

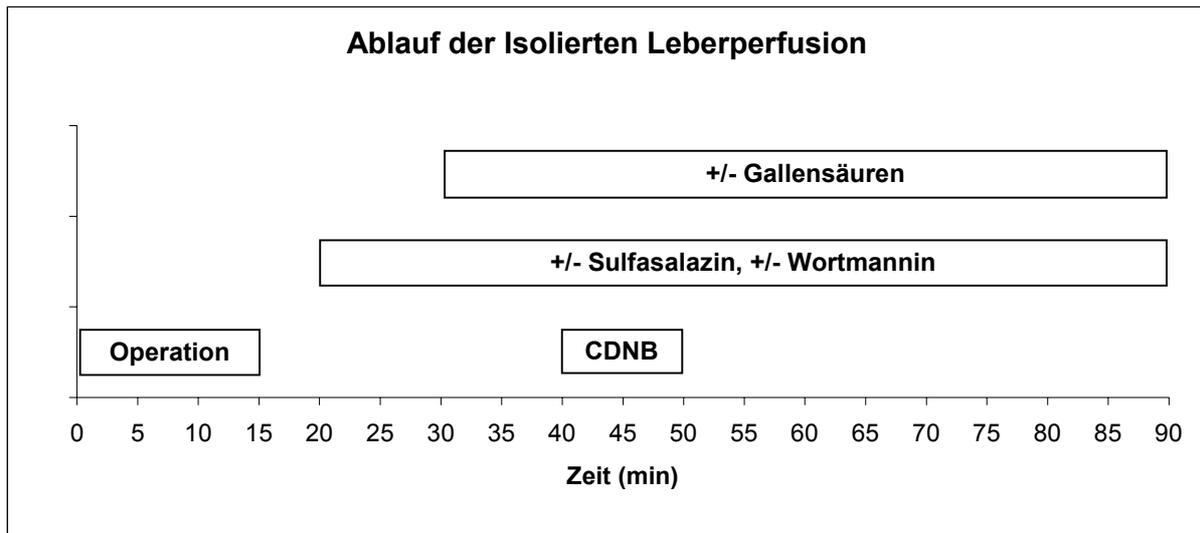


Abbildung 8: Versuchsprotokoll der Perfusion

Zur 90. min wurde das Experiment beendet, der anteriore Leberlappen exzidiert und gewogen. Mehrere Proben wurden in auf flüssigem Stickstoff vorgekühlten Methylbutan schockgefroren und anschließend auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Diese Gewebeproben wurden später zur Bestimmung der aktivierten PKB bzw. zur immunhistochemischen Detektion der Apoptose verwendet. Die Restleber wurde entnommen und nach Abwiegen verworfen.

2.2.3 Bestimmung der biliären Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP

Das Multidrug-Resistenz-assoziierte-Protein 2 (Mrp2) stellt ein Transportprotein des Hepatozyten an dessen apikaler Membran dar und dient unter anderem der Sekretion organischer Anionen in den Gallenkanalikus (siehe **Kap. 1.1.1.2**). Um diese sekretorische Kapazität der Leber während der Perfusionsexperimente zu erfassen und zu quantifizieren, wurde 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) eingesetzt, welches als Glutathionkonjugat über Mrp2 ausgeschieden wird und in der gesammelten Gallenflüssigkeit als GS-DNP messbar wird. CDNB wurde über 10 min in einer Konzentration von $30\text{ }\mu\text{mol/l}$ in die Pfortader infundiert. Mit dieser Konzentration ist eine Sättigung der apikalen Transportsysteme für GS-DNP in der perfundierten Rattenleber gewährleistet. Die ausgeschiedene Menge an GS-DNP korreliert somit gut mit Sekretionsleistung und Anzahl der Transportpumpen des Mrp2-Systems an der apikalen Plasmamembran der Leberzellen [204].

Hintergrund:

Im Hepatozyten wird CDNB unter Abspaltung von HCl als Thioether an Glutathion gebunden. Nach Ausscheidung des dabei entstandenen Modellansions Dinitrophenyl-Glutathion (GS-DNP) über das apikale Transportprotein Mrp2 kann seine Konzentration in der gesammelten Gallenflüssigkeit photometrisch bei einer Wellenlänge von 335 nm erfasst werden.

Durchführung:

Für jede Gallenprobe wurden 1000 µl Aqua bidest. in einer PS-Halbmikro-Einmalküvette vorgelegt. Anschließend wurden je 5 µl pro Gallenprobe (bei geringerer vorhandener Probenmenge weniger) in die entsprechende Küvette pipettiert und mittels Rührspatel blasenfrei vermischt. Die Extinktion wurde gegen Aqua bidest. als Referenzprobe bei 335 nm im Photometer gemessen.

Die Konzentration (c) wurde über folgende Formel bestimmt:

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

E: Extinktion

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

d: Schichtdicke (hier: 1 cm)

V_{Probe} : Volumen der Probe

V_{ges} : Gesamtvolumen in der Küvette

Da die Galle eine nicht konstante Eigenabsorption bei 335 nm besitzt, mussten die Extinktionswerte entsprechend korrigiert werden. Der letzte Extinktionswert vor CDNB-Zugabe galt somit als Nullpunkt und wurde von den anderen Extinktionswerten abgezogen. Der Einfluss unterschiedlicher Probenvolumina wurde berücksichtigt.

2.2.4 Aktivitätsmessung der LDH im hepatovenösen Effluat

Die Laktatdehydrogenase (LDH) befindet sich als Enzym der Glykolyse im zytosolischen Kompartiment jeder Zelle. Tritt ein gravierender Zellschaden auf, so kommt es zum Verlust der Membranintegrität mit konsekutiver Abgabe der zytosolischen Enzyme in das umgebende Medium.

Eine photometrische Bestimmung der LDH-Aktivität im hepatovenösen Effluat gab uns Aufschluss über die Höhe des Leberzellschadens unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen [179].

Hintergrund:

Bei Anwesenheit von LDH wird Pyruvat durch NADH/H⁺ zu Laktat reduziert, gleichzeitig entsteht NAD⁺.



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

Durchführung:

Es wurde ein Standardtest [19] unter Zugabe von 500 µl 0,60 mM Pyruvatpuffer und 10 µl NADH-Lösung (10 mg/ml) zu 500 µl Effluat verwendet. Bei einer Wellenlänge von 339 nm wurde die Extinktion 1, 2, 3 bzw. 4 min nach dem Start der Reaktion gemessen.

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

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

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

ΔE : Extinktionsänderung

ε : molarer Extinktionskoeffizient (l/(mmol x cm)); hier: ε (399 nm) = 6,3 l/(mmol x cm)

d: Lichtweg (hier: 1 cm)

Δt : Meßabstand (min)

V: Volumen des gesamten Testansatzes in der Küvette

V_{Probe} : Volumen der Probe

Lösungen:

Pyruvatpuffer: 66,6 mg Natriumpyruvat ad 1000 ml 50 mM Phosphatpuffer (8,71 g K_2HPO_4 ad 1000 ml Aqua bidest., 3,40 g KH_2PO_4 ad 500 ml Aqua bidest.; Lösungen wurden gegeneinander auf pH 7,5 titriert und bei 4 °C aufbewahrt)

NADH-Lösung (10 mg/ml): 10 mg NADH- Na_2 wurden in einem Eppendorf-Cup eingewogen und in 0,5 % $NaHCO_3$ -Lösung gelöst.

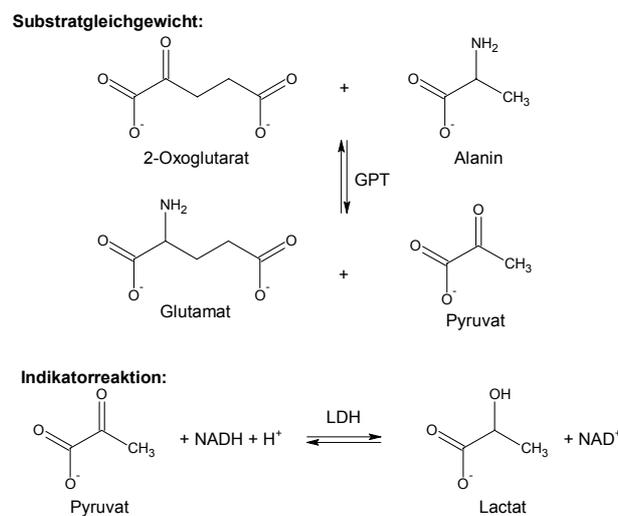
2.2.5 Aktivitätsmessung der GPT im hepatovenösen Effluat

Als zytoplasmatisches Enzym, das bereits bei leichten Irritationen der Zelle freigesetzt wird, reagiert die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) sehr empfindlich und ist als leberspezifisch zu werten.

Die Aktivität der GPT im hepatovenösen Effluat wurde als ein weiterer Indikator des Leberzellschadens gemessen.

Hintergrund:

Die Aminogruppe des L-Alanin wird durch die GPT mit Hilfe des Coenzym Pyridoxalphosphat auf 2-Oxoglutarat übertragen. Dabei entstehen Pyruvat und L-Glutamat. Als Indikator für die Aktivität der GPT dient die LDH-Reaktion. Das in erster Reaktion entstandene Pyruvat wird durch die LDH mit NADH/H⁺ zu Laktat reduziert. Durch einen Überschuss an LDH ist die Indikatorreaktion nicht der begrenzende Faktor für die Gesamtreaktion. Die umgesetzte Menge an NADH/H⁺ ist der an L-Alanin äquimolar.



Das entstehende NAD⁺ absorbiert nicht bei 399 nm. Daher kann durch eine photometrische Messung der Absorptionsabnahme die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden (siehe **Kap. 2.2.4**). Es gilt 1 U = 1 mol/min.

Durchführung:

Wir verwendeten einen kommerziellen Standardtest (GPT Optimized UV-Test, Sigma) unter Zugabe von 800 µl GPT-Reagenz A (Puffer, LDH, NADH, L-Alanin) und 100 µl GPT-Reagenz B (2-Oxoglutarat) zu 400 µl Effluat. Bei einer Wellenlänge von 339 nm wurden die Absorptionswerte 1, 2, 3 bzw. 4 min nach dem Start der Reaktion gemessen.

Die Volumenaktivität (z) der GPT im hepatovenösen Effluat wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta c \cdot V}{\Delta t} = \frac{\Delta A \cdot V}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d}$$

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta A \cdot V}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}}$$

ΔA : Absorptionsänderung

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

d: Lichtweg (hier: 1 cm)

Δt : Meßabstand (min)

V: Volumen des gesamten Testansatzes in der Küvette

V_{Probe} : Volumen der Probe

2.2.6 Bestimmung der Gallensäurenkonzentration im hepatovenösen Effluat

Um die Aufnahme der über die Pfortader angebotenen Gallensäuren in die Leberzellen erfassen zu können, wurde eine gaschromatographische Analyse der Gallensäurenkonzentration im hepatovenösen Effluat durchgeführt [24, 184].

Das gesammelte Effluat wurde folgendermaßen aufbereitet:

In 2 ml Effluat wurden 50 μ l einer internen Standardlösung (2,5 μ g Hyodeoxycholsäure gelöst in 50 μ l Methanol) pipettiert. Anschließend wurde dieses Gemisch langsam durch vorbereitete Bond-Elut-C18-Säulen (Varian, Harbor City, CA, USA) gesogen, welche vor ihrer Verwendung mit 5 ml Methanol, 5 ml Aqua bidest. und abschließend mit 2 ml 0,1 M NaOH gewaschen wurden. Nach Auswaschen der Säulen mit je 5 ml 0,1 M NaOH bzw. Aqua bidest. folgte eine Elution der Gallensäuren mit 6 ml eines Methanol-Wasser-Gemisches (75 : 25).

Das gewonnene Eluat wurde im Wasserbad bei 64 °C unter Stickstoff eingedampft, die Gallensäurenkonjugate wurden folgendermaßen enzymatisch hydrolysiert. Der Rückstand aus der Eindampfung wurde in 4 ml Aqua bidest. aufgenommen, und der pH-Wert wurde mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 bis 6,0 eingestellt. Anschließend

erfolgte die Zugabe von 400 µl 0,1 M Natriumacetatpuffer, und die Lösung wurde für 1 min ins Ultraschallbad gestellt.

Nach Zugabe von 20 µl einer Enzymlösung (Choloylglyzinhydrolase, 1000 U/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 µl 0,2 M EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung und 100 µl 0,2 M Mercaptoethanol-Lösung wurde das Gemisch im Wasserbad bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde der pH-Wert nach dem Abkühlen der Proben mit 1 M HCl auf 3,5 eingestellt, und die Proben wurden langsam durch vorbereitete Lipidex[®]-1000-Säulen gesogen. Zur Vorbereitung wurden leere 1 ml-Bond-Elut-Säulen mit Lipidex[®] 1000 (Packard Instrument B.V. Chemical Operations, Groningen, Niederlande) gefüllt und anschließend mit 10 ml Methanol bzw. 3 ml 0,01 M HCl gewaschen.

Es folgte ein Waschvorgang mit zweimal 7 ml 0,01 M HCl und dreimal 7 ml Aqua bidest.. Nach einer Elution der Proben mit 10 ml Methanol-Wasser-Gemisch (75 : 25) wurden sie erneut im Wasserbad unter Stickstoff bei 64 °C eingedampft.

Zur Methylierung wurden 1 ml Methanol, 1 ml 2,2-Dimethoxypropan und 50 µl konzentrierte HCl zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur stengelassen und anschließend erneut im Wasserbad unter Stickstoff bei 64 °C abgedampft.

Zur Silylierung wurden 0,4 ml eines frischen Trimethylsilyl (TMS)-Reagens zugegeben und nach ausreichendem Schütteln für 15 min im Wasserbad bei 64 °C stengelassen. Zur Herstellung des TMS-Reagens wurden 1,5 ml Pyridin, 1 ml Hexamethyldisilazan und 0,5 ml Chlortrimethylsilan vermischt und 45 min lang bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nur der klare Überstand wurde für die Analyse verwendet.

Erneut wurde der Ansatz unter Stickstoff im Wasserbad bei 64 °C abgedampft. Der Überstand wurde in 1,5 ml Iso-Oktan aufgenommen und in Mini-Vials überführt. Schließlich wurde das Iso-Oktan unter Stickstoff abgedampft, und der verbleibende Rest in 25 µl Iso-Oktan gelöst.

Die entstandenen Methylestertrimethylsilylätherderivate wurden im Anschluss gaschromatographisch auf Silikatkapillarsäulen (Länge 25 m, Durchmesser 0,32 mm) mit chemisch gebundenen OV-1701 getrennt. Als Gaschromatograph wurde ein Carlo Erba Fractovap 4160 verwendet, als Trägergas Wasserstoff ($p = 0,6 \text{ kg/cm}^2$). Die Detektion der Gallensäuren erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors, wobei die untere Nachweisgrenze $0,2 \mu\text{M}$ betrug.

2.2.7 Darstellung der aktivierten Caspase 3 und des Zytokeratin 18-Filaments im Lebergewebe

Die Caspase 3 ist wesentlicher Bestandteil der enzymatischen Downstream-Kaskade im apoptotischen Signalweg einer Zelle. Sie stellt eine der Effektorcaspasen dar, die für die Vermittlung des Zelltodes durch Degradation zellulärer Proteine verantwortlich sind. Zu ihren Substraten zählen auch Strukturproteine, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. In der Leberzelle wird beispielsweise das Zytokeratin 18 (CK 18), ein Typ 1 Zytokeratin, durch aktivierte Caspase 3 abgebaut [126].

Ziel war eine gemeinsame Darstellung der aktivierten Caspase 3 und des konsekutiven Zusammenbruchs des Zytokeratin 18-Netzwerks im Lebergewebe. Dies wurde durch immunhistochemische Markierung der Caspase 3 und des Zytokeratins 18 mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen und Beobachtung durch ein konfokales Laserscan-Mikroskop erreicht.

Aus den nach der Perfusion auf $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Lebergewebeproben wurden mit Hilfe eines Cryotoms bei $-16 \text{ }^\circ\text{C}$ ca. $4 \mu\text{m}$ dünne Gewebeschnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgenommen und bei Raumluft trocknungsfixiert. Nach ausreichender Trocknungszeit wurden die Schnitte in eine Färbeschale überführt und 10 min lang mit auf $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühltem Aceton fixiert. Anschließend wurden sie erneut luftgetrocknet und dann für 1 h mit $4 \mu\text{g/ml}$ eines polyklonalen Kaninchen-anti-Caspase 3-Antikörpers inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte kurz mit PBS gewaschen und im Anschluss für 30 min mit einem Tetramethylrhodamin (TRITC)-konjugierten Schwein-anti-Kaninchen IgG inkubiert. Dabei wurde durch Abdecken der Schnitte sichergestellt, dass überflüssige Lichtexposition vermieden wurde. Nach

erneutem Waschen mit PBS wurde als 2. Primärantikörper ein monoklonaler Maus-anti-Zytokeratin 18-Antikörper in einer Konzentration von 1,5 µg/ml für ca. 30 min appliziert. Es folgte ein Spülen der Schnitte mit PBS und eine 30 minütige Inkubation mit dem als 2. Sekundärantikörper verwendeten Fluoreszein Isothiozyanat (FITC)-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG. Danach wurden die nicht gebundenen Reste des Antikörpers durch Waschen mit PBS entfernt. Es folgte ein kurzes Spülen mit destilliertem Wasser und 96 % Äthanol und anschließend das Eindecken der Schnitte mit Mowiol. Bis zur Betrachtung wurden die Schnitte lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Negativkontrollen wurden durch Weglassen der Primärantikörper mitgeführt. Es wurden ausschließlich Bilder verglichen, deren Herstellung in allen Schritten parallel verlief.

Die Fluoreszenzfärbung wurde mittels einer MRC 600 konfokalen Laserscan-Kamera (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) sichtbar gemacht, die an ein Zeiss Axiophot Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) angeschlossen war. Zur Darstellung der beiden unterschiedlichen Signale wurden verschiedene Exzitationswellenlängen aus einem Krypton/Argon-Laser verwendet (488 nm für FITC; 568 nm für TRITC). Verschiedene Filter ermöglichten schließlich die Aufnahme und Speicherung von Bildern der optisch identischen Brennebene. Überlagerung von Grün (FITC; CK 18) und Rot (TRITC; Caspase 3) resultierte in einem gelben Signal.

2.2.8 Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der PKB

Die Proteinkinase B (PKB/Akt) ist Substrat der PI₃-Kinasen und gilt als sensitiver Indikator für deren Aktivität. PKB/Akt wird mit der Vermittlung von Überlebenssignalen der Zelle in Verbindung gebracht (siehe **Kap. 1.1.2.3**).

Schockgefrorenes Lebergewebe (-80 °C) aus den Perfusionsexperimenten wurde in eiskaltem Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Glycerolphosphat, 200 mM PMSF, 100 mM Na₃VO₄, 500 µM Okadaic acid, 5 g/l Aprotinin, 23,8 g/l Leupeptin; pH 7,5) mit einem Ultraschallhomogenisator homogenisiert und für 5 min bei 16500 g und 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut gelöst. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts jeder Probe mit der Methode nach Bradford [30].

Zur PKB-Bestimmung wurde die Proteinkonzentration schließlich auf 150 µg/25 ml eingestellt. Aliquots jeder Probe wurden einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit 10 % Polyacrylamidgel unterzogen. Die Trennung erfolgte bei 200 V für 48 min. Die Proteine wurden anschließend 1 h lang bei 100 V unter Eiskühlung auf Immobilon-P-Membranen übertragen, woraufhin diese bei Raumtemperatur für 60 min in Blockingpuffer (4 g BSA auf 80 ml TBST: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween; pH 7,6) gelegt wurden. Anschließend wurden sie über Nacht mit einem Phospho-PKB (Akt Ser-473) Antikörper in der Verdünnung von 1:1000 in Blockingpuffer inkubiert, um die aktivierte Form der PKB zu erfassen. Die Membranen wurden dann unter ständigem Schütteln dreimal für 5 min in TBST gewaschen und für 60 min bei Raumtemperatur mit Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin G-Antikörpern (1:5000) inkubiert. Dann wurden die Membranen erneut 5 x 5 min in TBST gewaschen.

Die gebundenen Antikörper wurden mittels Auftrag eines Chemilumineszenz-Reagens und Exposition gegenüber eines Kodak BiomaxMR Films sichtbar gemacht.

Um die Gesamt-PKB messen zu können, wurden die Membranen gestrippt. Hierzu wurden sie 15 s in Methanol, anschließend 4 x 5 min in TBST gewaschen und 30 min bei 50 °C in Stripping-Puffer (7,6 g Tris, 20 g SDS, 7 ml 2-Mercaptoethanol; pH 6,8) geschüttelt. Daraufhin wurden sie erneut 6 x 5 min in TBST gewaschen, worauf die Gesamt-PKB in gleicher Art und Weise mit einem PKB-Antikörper (1:1000) bestimmt wurde.

Die PKB-Banden wurden über ihr Molekulargewicht mittels Molekulargewichtsmarkern identifiziert, die auf jedes Gel aufgetragen wurden.

Die Quantifizierung der Banden von Phospho- und Gesamt-PKB erfolgte densitometrisch (NIH Image Densitometric Analysis 1.54, Bethesda, Md., 1994) mit Hilfe des Computerprogramms TINA (Version 2.10g von Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt).

2.3 Materialien

Antikörper:

Immunzytochemie: Anti-cleaved-Caspase 3-Antikörper von Cell Signaling (Beverly, MA, USA), Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper Alexa Flour von Mobitec (Göttingen).

Immunhistochemie: Polyklonaler Kaninchen-anti-Caspase 3-Antikörper von Cell Signaling (Beverly, MA, USA), monoklonaler Maus-anti-Zytokeratin 18-Antikörper von Progen (Heidelberg), Tetramethylrhodamin (TRITC)-konjugierter Schwein-anti-Kaninchen IgG von Dako (Glostrup, Dänemark), Fluoreszein Isothiozyanat (FITC)-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG von Zymed (San Francisco, CA, USA).

PKB-Western Blot: Anti-Phospho-PKB (Ser-473)-Antikörper von BD Pharmigen (Heidelberg), Anti-Gesamt-PKB-Antikörper von Cell Signaling (Beverly, MA, USA), Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper von Bio-Rad (München).

Sonstige Materialien, Chemikalien und Biochemikalien:

Optimem und G418 Geniticin von Gibco (Langley, OK, USA), Fugene-Transfektions-Reagenz von Roche Diagnostics (Mannheim), Kernfarbstoff Höchst 33342 von Mobitec (Göttingen). Vectashield mounting medium von Vector Labs (Burlingame, CA, USA), Mowiol von Höchst (Frankfurt/Main), Immobilon-P Membranen von Millipore (Eschborn), Western Blot-Chemilumineszenzreagenz und [³H]-markierte Taurocholsäure von PerkinElmer Life Science (Boston, Ma, USA), Molekulargewichtsmarker von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Biomax MR Film von Eastman Kodak (Rochester, NY, USA), Szintillations-Cocktail Ultima Gold[®] von Canberra Packard (Frankfurt/Main), Bond-Elut-C18-Kartuschen von Analytichem International (San Diego, CA, USA), Silikatkapillarsäulen mit chemisch gebundenen OV-1701 von Chrompack (Nijmegen, Niederlande).

1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) von ICN Biomedicals Inc. (Aurora, OH, USA), TNF- α von BioSource International (Camarillo, CA, USA), Wortmannin, GCDCA, TCDCA, Na-Taurocholat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Sulfasalazin, 5-ASA, Sulfapyridin und Actinomycin D sowie alle anderen Reagenzien von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Alle verwendeten Chemikalien und Biochemikalien waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

2.4 Tiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 229 ± 16 g wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Sie befanden sich bis zum Beginn der Experimente in Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 24 °C und einem 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Freier Zugang zu Nahrung und Wasser war gewährleistet.

2.5 Statistik

Die Resultate der Experimente wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) beschrieben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden je nach Experimentaufbau mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test bzw. einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) und einem angeschlossenen Bonferroni-Test für multiple Vergleiche beschrieben. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel 97 und WinStat von Microsoft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung und Rolle der PI₃-Kinasen im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Rattenlebern wurden isoliert über 90 min mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die beiden Konjugate der Chenodeoxycholsäure (TCDCA und GCDCA) und der PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin wurden allein oder in Kombination appliziert (siehe **Abbildung 8**, S. 37 und **Tabelle 1**, S. 36). Zwischen der 40. und 50. min wurde zusätzlich das organische Modellanion CDNB infundiert, um die Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 erfassen zu können.

3.1.1 Effekte der hydrophoben Gallensäure TCDCA

3.1.1.1 Gallenfluss

3.1.1.1.1 Kontrollen

DMSO:

Der Gallenfluss lag bei den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) von der 36. bis zur 40. min bei $1,17 \pm 0,20 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$. Als Folge der Infusion von CDNB (41. bis 50. min) war ein passagerer Anstieg des Gallenflusses bis max. $1,95 \pm 0,31 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$ zu verzeichnen, der auf das choloretische Potential des CDNB-Glutathion-Konjugates GS-DNP zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf ging der Gallenfluss langsam auf einen Wert von zuletzt $1,08 \pm 0,12 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$ zurück. Die gute Sekretionsleistung der Leber über den gesamten Verlauf des Experiments hinweg kann als Hinweis auf eine schonende Perfusionstechnik gewertet werden.

Wortmannin:

Unter Gabe des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (**Gruppe B**) zeigte der Gallenfluss während der Versuche keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 9**).

Gruppe	A (Kontrolle)	B (Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	Gallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)	Gallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)
20	1,31 \pm 0,13	1,60 \pm 0,22
25	1,32 \pm 0,18	1,58 \pm 0,18
30	1,31 \pm 0,23	1,52 \pm 0,18
35	1,22 \pm 0,21	1,46 \pm 0,17
40	1,17 \pm 0,20	1,43 \pm 0,16
45	1,41 \pm 0,27	1,60 \pm 0,22
50	1,80 \pm 0,30	1,99 \pm 0,24
55	1,95 \pm 0,31	2,09 \pm 0,26
60	1,69 \pm 0,29	1,83 \pm 0,24
65	1,45 \pm 0,21	1,61 \pm 0,21
70	1,34 \pm 0,20	1,50 \pm 0,18
75	1,26 \pm 0,18	1,41 \pm 0,18
80	1,19 \pm 0,16	1,30 \pm 0,19
85	1,14 \pm 0,15	1,20 \pm 0,22
90	1,08 \pm 0,12	1,07 \pm 0,26
Gesamtgallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times 50 \text{ min})$)	71,45 \pm 10,45	78,07 \pm 9,67

Tabelle 2: Gallenfluss bei Kontrollen \pm Wortmannin

(MW \pm SD, n = 6)

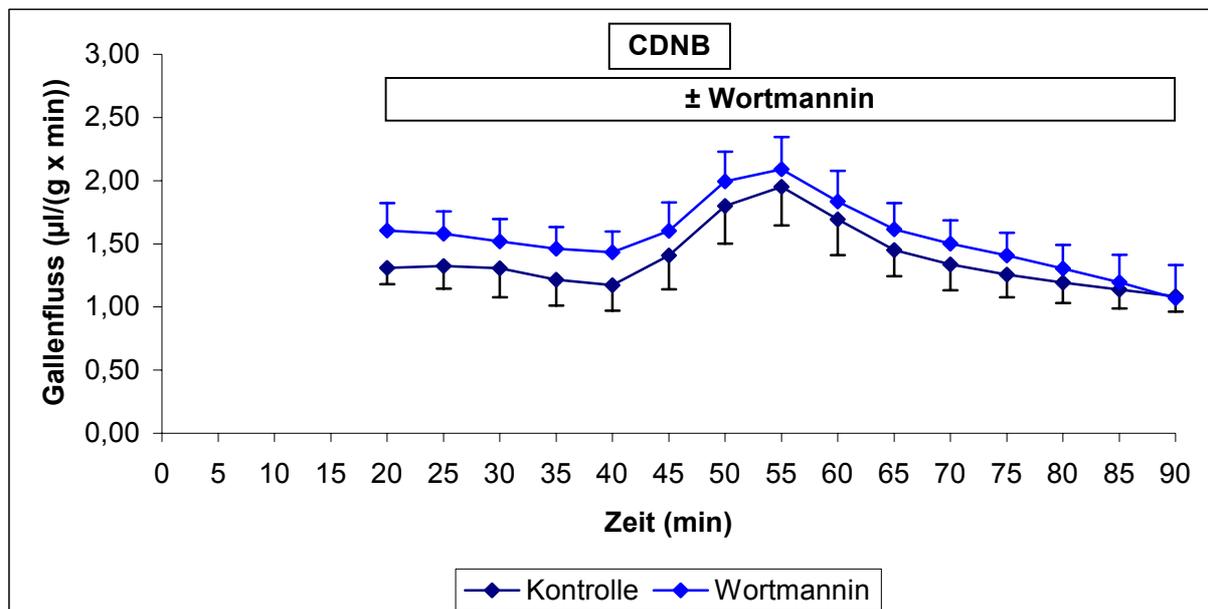


Abbildung 9: Gallenfluss bei Kontrollen \pm Wortmannin (100 nM)

(MW \pm SD, n = 6)

3.1.1.1.2 TCDCA

Nach Applikation der hydrophoben Gallensäure TCDCA (**Gruppe E**) nahm der Gallenflusses im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) signifikant ab ($p < 0,01$).

Die zusätzliche Infusion von Wortmannin (**Gruppe F**) zeigte tendentiell eine weitere leichte, jedoch nicht signifikante Verringerung des Gallenflusses (siehe **Tabelle 3** und **Abbildung 10**).

Gruppe	E (TCDCA 25 μ M)	F (TCDCA 25 μ M + Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	Gallenfluss (μ l/(g x min))	Gallenfluss (μ l/(g x min))
20	1,35 \pm 0,11	1,46 \pm 0,30
25	1,27 \pm 0,18	1,47 \pm 0,19
30	1,23 \pm 0,11	1,42 \pm 0,21
35	1,09 \pm 0,22	1,28 \pm 0,27
40	0,68 \pm 0,23	0,65 \pm 0,37
45	0,63 \pm 0,25	0,51 \pm 0,31
50	0,78 \pm 0,30	0,53 \pm 0,31
55	0,78 \pm 0,27	0,51 \pm 0,24
60	0,63 \pm 0,22	0,38 \pm 0,17
65	0,52 \pm 0,19	0,31 \pm 0,14
70	0,51 \pm 0,18	0,28 \pm 0,11
75	0,48 \pm 0,19	0,25 \pm 0,11
80	0,46 \pm 0,18	0,24 \pm 0,09
85	0,44 \pm 0,19	0,22 \pm 0,10
90	0,41 \pm 0,17	0,21 \pm 0,09
Gesamtgallenfluss (μ l/(g x 50 min))	28,27 \pm 10,12	19,35 \pm 8,18

Tabelle 3: Gallenfluss bei Gabe von TCDCA \pm Wortmannin

(MW \pm SD, n = 6)

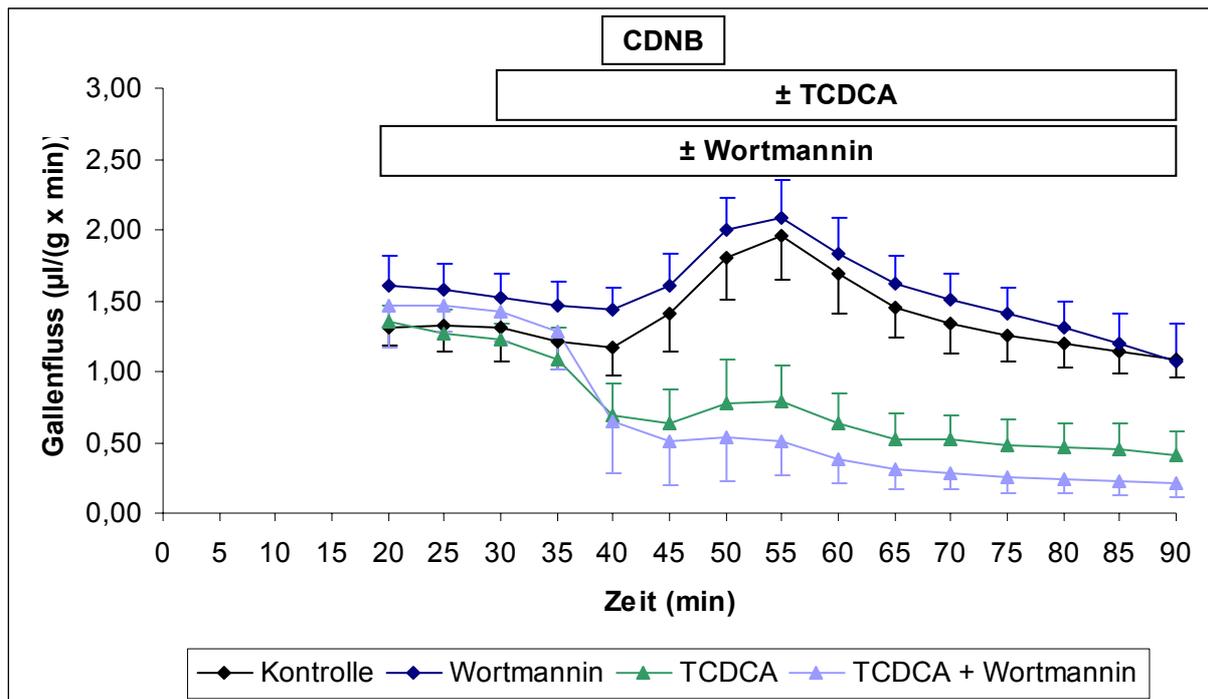


Abbildung 10: Gallenfluss bei Gabe von TCDCA 25 µM ± Wortmannin 100 nM
(MW ± SD, n = 6)

3.1.1.2 Biliäre Sekretion der Mrp2-Substrats GS-DNP

3.1.1.2.1 Kontrollen

Die biliäre Sekretion von GS-DNP belief sich bei den Kontrollen (**Gruppe A**) nach Infusion von CDNB (30 µM, 41. bis 50. min) auf $900,05 \pm 117,30$ nmol/(g Leber x 50 min). Das Sekretionsmaximum lag dabei 15 min nach Beginn der CDNB-Gabe.

Die Hemmung der PI_3 -Kinasen hatte unter Kontrollbedingungen (**Gruppe B**) keinen Einfluss auf den biliären GS-DNP-Efflux (siehe **Tabelle 4** und **Abbildung 11**).

Gruppe	A (Kontrolle)	B (Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
40	0 ± 0	0 ± 0
45	5,96 ± 3,57	6,23 ± 2,31
50	30,04 ± 5,45	32,64 ± 5,08
55	43,83 ± 6,73	44,96 ± 3,66
60	31,42 ± 4,65	31,24 ± 5,42
65	20,32 ± 2,31	20,14 ± 2,67
70	14,66 ± 1,58	15,19 ± 2,10
75	11,52 ± 1,23	12,43 ± 1,87
80	8,97 ± 0,86	9,72 ± 1,59
85	7,49 ± 0,36	7,41 ± 1,69
90	5,81 ± 0,47	5,77 ± 1,67
GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x 50 min))	900,05 ± 117,30	928,61 ± 115,89

Tabelle 4: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Kontrollen ± Wortmannin

(MW ± SD, n = 6)

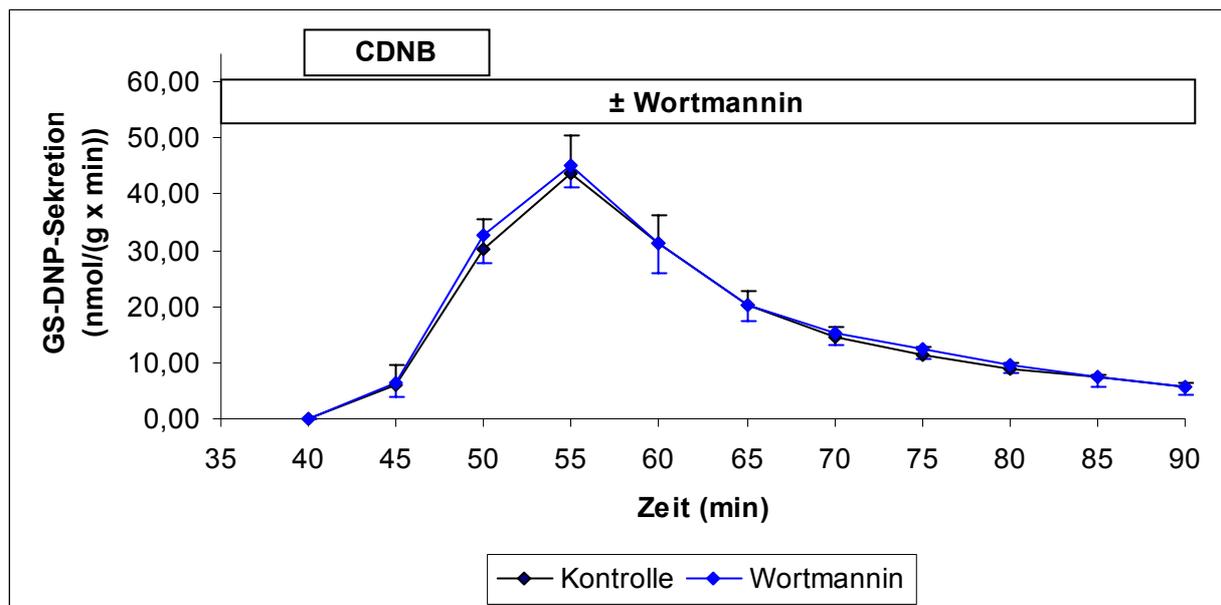


Abbildung 11: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Kontrollen ± Wortmannin 100 nM

(MW ± SD, n = 6)

3.1.1.2.2 TCDCA

Die Gabe von TCDCA (**Gruppe E**) führte verglichen mit den Kontrollversuchen (**Gruppe A**) zu einer deutlichen Reduktion der GS-DNP-Sekretion.

Das Hinzufügen von Wortmannin (**Gruppe F**) hatte einen weiteren leicht hemmenden Einfluss, der jedoch nicht signifikant war (siehe **Tabelle 5** und **Abbildung 12**).

Gruppe	E (TCDCA 25 μ M)	F (TCDCA 25 μ M + Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
40	0 \pm 0	0 \pm 0
45	0,70 \pm 0,00	0,52 \pm 0,78
50	8,17 \pm 5,13	4,41 \pm 5,08
55	11,69 \pm 4,66	5,82 \pm 5,09
60	7,27 \pm 2,27	3,63 \pm 2,71
65	4,11 \pm 1,34	2,27 \pm 1,13
70	2,89 \pm 0,97	1,44 \pm 0,80
75	2,18 \pm 0,81	0,91 \pm 0,61
80	1,71 \pm 0,60	0,69 \pm 0,45
85	1,32 \pm 0,52	0,48 \pm 0,35
90	0,95 \pm 0,35	0,32 \pm 0,23
GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x 50 min))	204,86 \pm 76,67	102,45 \pm 82,97

Tabelle 5: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von TCDCA \pm Wortmannin

(MW \pm SD, n = 6)

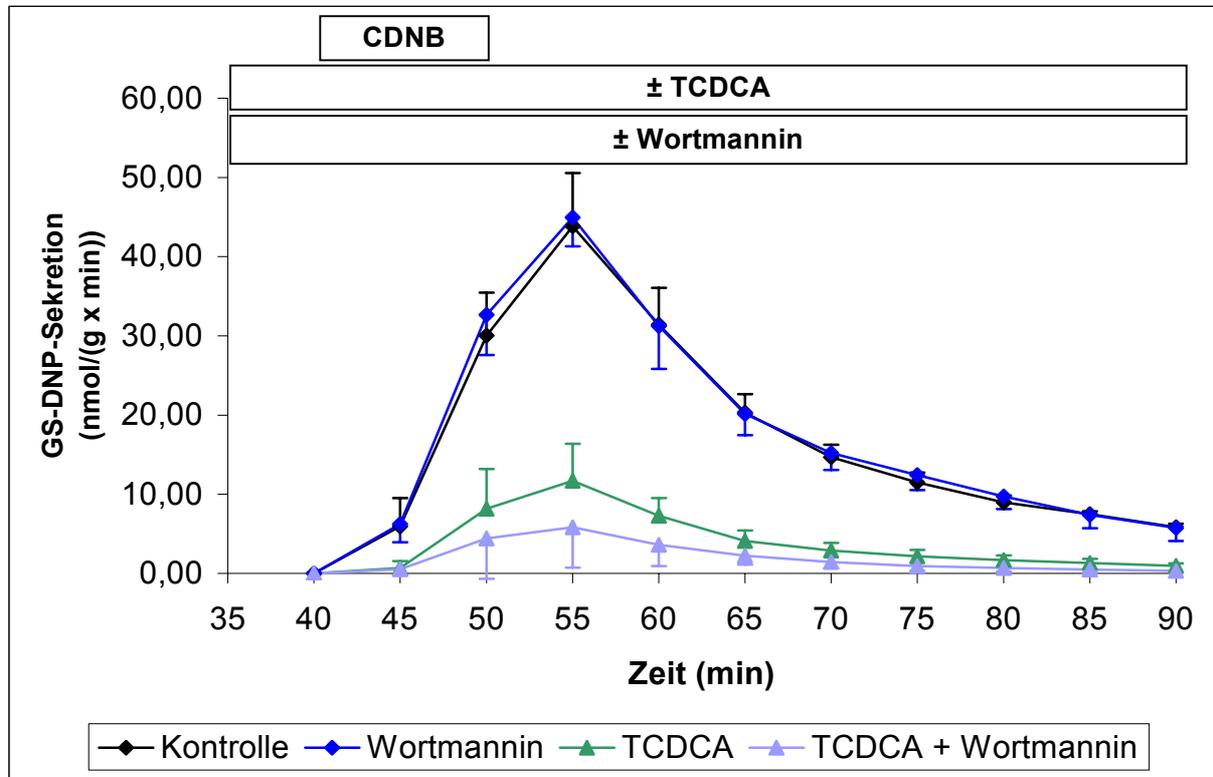


Abbildung 12: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von TCDCA 25 μ M \pm Wortmannin 100 nM

(MW \pm SD, n = 6)

3.1.1.3 Aktivität der LDH und der GPT im hepatovenösen Effluat

Die Aktivität der LDH und die Aktivität der GPT im hepatovenösen Effluat wurden als Indikatoren für den hepatischen Zellschaden unter Perfusionsbedingungen gemessen [179]. Die stets parallele Freisetzung beider Enzyme über alle Versuchsgruppen hinweg kann als Beleg für die Verlässlichkeit dieser Testmethode gewertet werden.

Aktivität der LDH im hepatovenösen Effluat

Bei den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) blieb die LDH-Aktivität während der gesamten Versuchsdauer auf stabil niedrigem Niveau. Dies spricht dafür, dass die schonende Operations- und Perfusionstechnik eine ausreichende Annäherung des experimentellen Modells an physiologische Verhältnisse ermöglichte. Die Zugabe von Wortmannin (**Gruppe B**) lieferte vergleichbar niedrige Werte.

Nach alleiniger Gabe der hydrophoben Gallensäure TCDCA (**Gruppe E**) kam es zu einem signifikanten LDH-Anstieg, wobei die Höhe des Schädigungsparameters von der 65. bis zur 85. min nicht mehr wesentlich zunahm.

Die gleichzeitige Applikation von Wortmannin (**Gruppe F**) führte zu einer sehr starken Erhöhung des TCDCA-vermittelten Leberzellschadens. Der LDH-Anstieg lag bis zu vierfach über dem bei alleiniger Gallensäuren-Gabe (siehe **Tabelle 6** und **Abbildung 13**).

Versuchsgruppe	LDH - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
A Kontrolle	1,3 ± 0,7	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,7	1,1 ± 1,0
B Wortmannin 100 nM	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,5	0,8 ± 0,5	3,0 ± 4,9
E TCDCA 25 µM	1,7 ± 2,0	32,6 ± 13,3 ^a	65,1 ± 16,7 ^a	69,7 ± 20,2 ^a
F TCDCA 25 µM + Wortmannin 100 nM	1,7 ± 1,4	136,6 ± 73,4 ^b	183,8 ± 52,1 ^c	169,9 ± 38,9 ^c

Tabelle 6: Effekt von TCDCA ± Wortmannin auf die LDH-Aktivität

(MW ± SD, n = 6; ^a p < 0,01 vs. Kontrolle; ^b p < 0,05 vs. TCDCA; ^c p < 0,01 vs. TCDCA)

Aktivität der GPT im hepatovenösen Effluat

Unbehandelte Kontrollen (**Gruppe A**) und alleinige Gabe von Wortmannin (**Gruppe B**) waren durch geringe GPT-Aktivität über die gesamte Versuchsdauer gekennzeichnet.

TCDCA (**Gruppe E**) führte zu einem deutlichen Anstieg der GPT-Abgabe in das Effluat, der unter zusätzlicher Hemmung der PI₃-Kinasen (**Gruppe F**) nochmals bis zu dreifach stärker ausfiel (siehe **Tabelle 7** und **Abbildung 13**).

Versuchsgruppe	GPT - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
A Kontrolle	2,2 ± 1,9	1,1 ± 0,9	0,9 ± 1,4	2,1 ± 1,0
B Wortmannin 100 nM	0,9 ± 1,5	0,6 ± 0,9	0,1 ± 0,5	1,9 ± 3,9
E TCDCA 25 µM	2,2 ± 2,3	6,7 ± 2,0 ^a	9,9 ± 3,6 ^a	10,4 ± 3,4 ^a
F TCDCA 25 µM + Wortmannin 100 nM	1,9 ± 2,3	22,6 ± 11,8 ^b	27,7 ± 8,01 ^b	18,1 ± 3,5 ^b

Tabelle 7: Effekt von TCDCA ± Wortmannin auf die GPT-Aktivität

(MW ± SD, n = 6; ^a p < 0,01 vs. Kontrolle; ^b p < 0,01 vs. TCDCA)

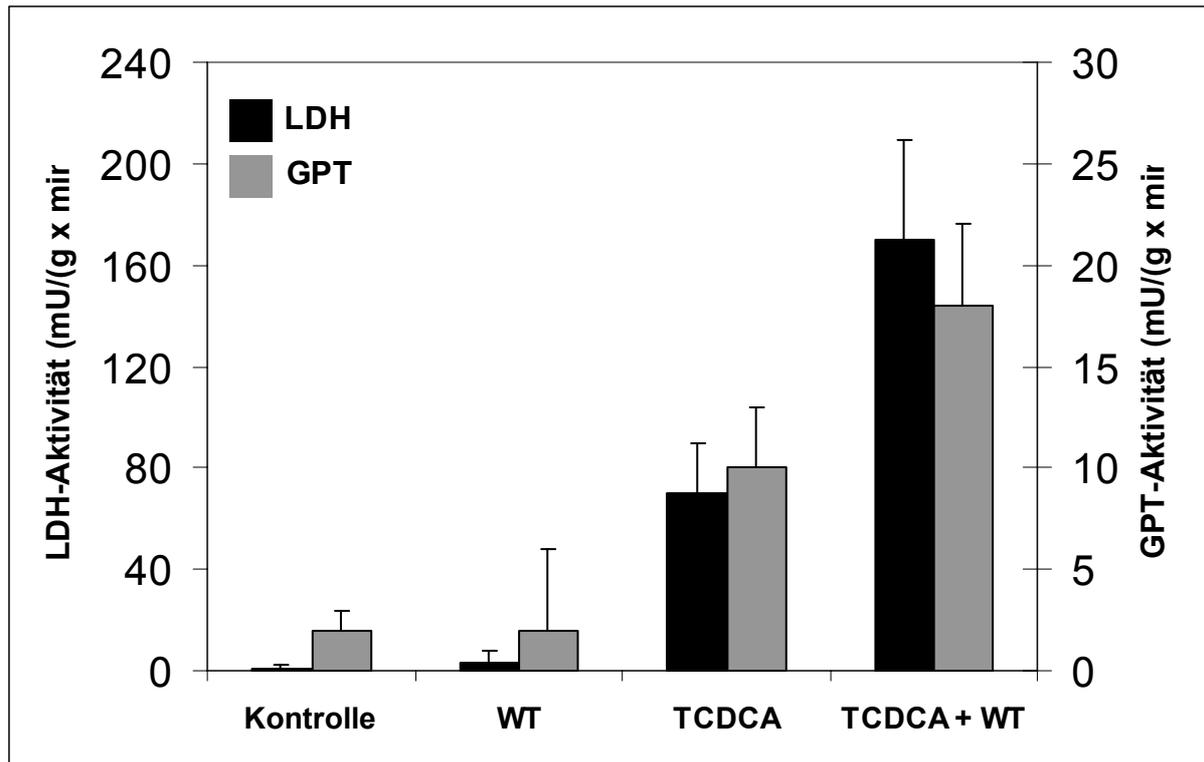


Abbildung 13: Effekt von TCDCA 25 μ M \pm Wortmannin 100 nM auf die Aktivität von LDH und GPT im Effluat zur 85. min

(MW \pm SD, n = 6)

3.1.1.4 Aktivierte Caspase 3 und Zytokeratin 18-Filament im Lebergewebe

Am Ende jedes Perfusionsversuchs wurde Lebergewebe exzidiert und für eine immunhistochemische Erfassung von Apoptose konserviert. Zur Markierung apoptotischer Leberzellen diente die gleichzeitige Darstellung aktivierter Caspase 3 und des Zytokeratin 18-Filamentnetzwerks, das nach Aktivierung eines apoptotischen Programms einen charakteristischen Zusammenbruch zeigt [56].

Unter Kontrollbedingungen (**Gruppe A**) waren apoptotische Zellen nur vereinzelt und in minimaler Anzahl vorhanden. Bei Gabe von Wortmannin (**Gruppe B**) lag der Anteil apoptotischer Zellen vergleichbar niedrig.

In mit TCDCA perfundierten Lebern (**Gruppe E**) waren apoptotische Hepatozyten ca. 3,1-fach häufiger zu beobachten als unter Kontrollbedingungen. Die gleichzeitige Hemmung der PI₃-Kinasen (**Gruppe F**) führte zu einer weiteren Steigerung der

Apoptoserate, die ca. 3,3-fach über dem Niveau bei alleiniger TCDCA-Gabe lag und ca. 10,4-fach über Kontrollniveau (siehe **Abbildung 14**).

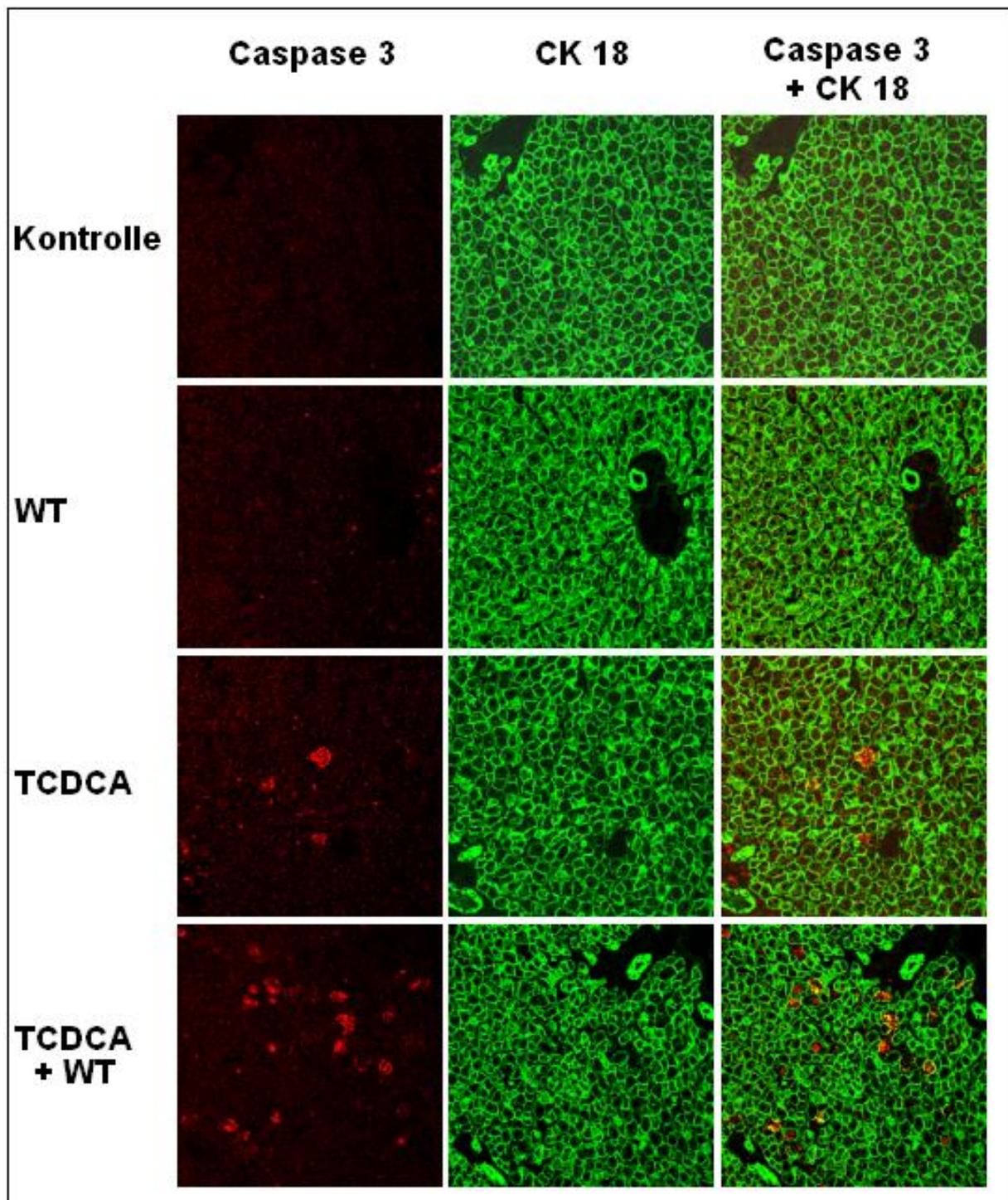


Abbildung 14: Effekt von TCDCA 25 μM \pm Wortmannin 100 nM auf die aktivierte Caspase 3 und das Zytokeratin 18-Filamentnetzwerk im Lebergewebe

(Darstellung repräsentativer Areale in 250-facher Vergrößerung)

3.1.1.5 Phosphorylierung der PKB

Die Proteinkinase B (PKB) ist ein Zielsubstrat der PI_3 -Kinasen. Eine Phosphorylierung an ihrem Ser-473-Rest gilt als sensibler Indikator für PI_3 -Kinase-Aktivität [59, 211]. Der Phosphorylierungsgrad der PKB/Akt wurde daher zur Erfassung der PI_3 -Kinase-Aktivität bestimmt. Lebergewebe aus den jeweiligen Perfusionsgruppen wurde hierzu mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot untersucht.

Unter Kontrollbedingungen (**Gruppe A**) fand sich eine geringgradige Ser 473-Phosphorylierung der PKB. Wortmannin (**Gruppe B**) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die PKB-Phosphorylierung.

TCDCA (**Gruppe E**) führte zu einer gesteigerten Aktivierung der PKB bis zu 298 % über Kontrollniveau ($p < 0,05$, $n = 6$).

Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe F**) hob diese TCDCA-induzierte Erhöhung der PKB-Phosphorylierung vollständig auf (siehe **Abbildung 15**).

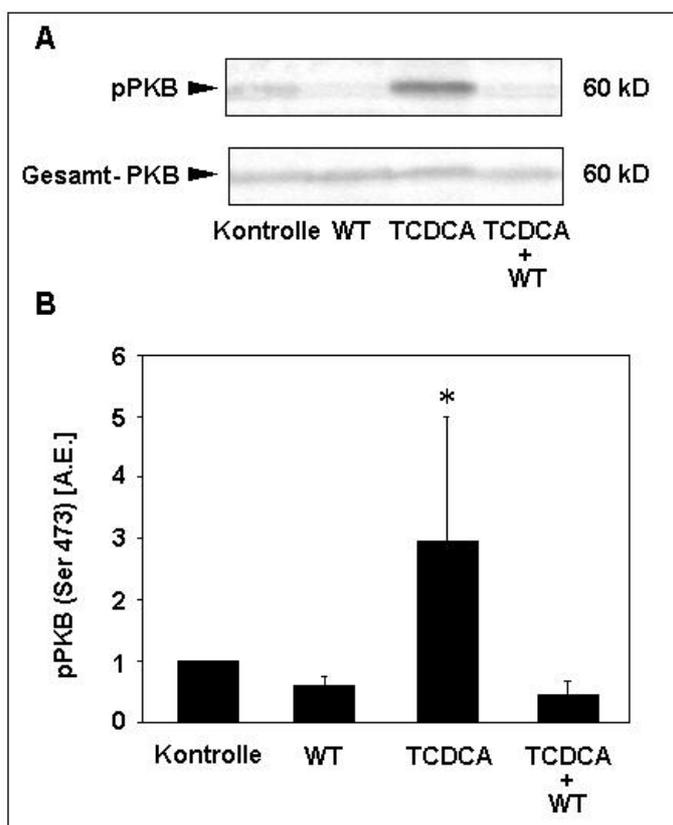


Abbildung 15:

Effekt von TCDCA 25 μ M \pm Wortmannin 100 nM auf die Aktivierung der PKB im Lebergewebe

A) Repräsentativer Immunoblot:
 obere Banden: pPKB (Ser-473)
 untere Banden: Gesamt-PKB

B) Densitometrie: pPKB im Lebergewebe:
 (MW \pm SD, $n = 6$; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

3.1.1.6 Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat

Im Effluat aus der Vena cava inferior wurde die Konzentration der Gallensäuren mittels Gaschromatographie bestimmt. Dies lieferte eine indirekte Aussage über die Gallensäureaufnahme der Leber.

Zur 65. min erschienen bei alleiniger Gabe von 25 μM TCDCA (**Gruppe E**) $6,3 \pm 2,1$ $\mu\text{mol/l}$ im hepatovenösen Effluat. Die Zugabe von Wortmannin (**Gruppe F**) schien diesen Anteil zu erhöhen ($11,2 \pm 2,4$ $\mu\text{mol/l}$), allerdings fiel dieser Unterschied nicht signifikant aus (siehe **Abbildung 16**).

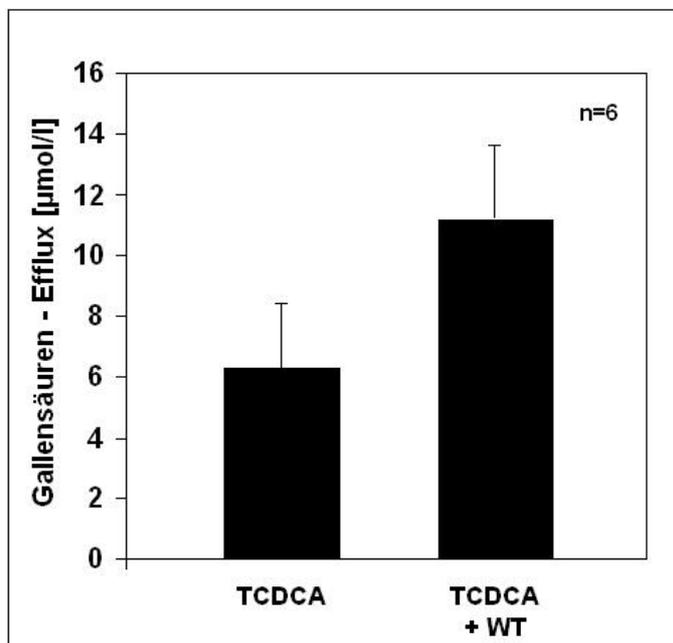


Abbildung 16:

Effekt von TCDCA 25 μM \pm Wortmannin 100 nM auf den hepatovenösen Gallensäuren - Efflux

(MW \pm SD, n = 6)

3.1.2 Effekte der hydrophoben Gallensäure GCDCA

3.1.2.1 Gallenfluss

3.1.2.1.1 Kontrollen

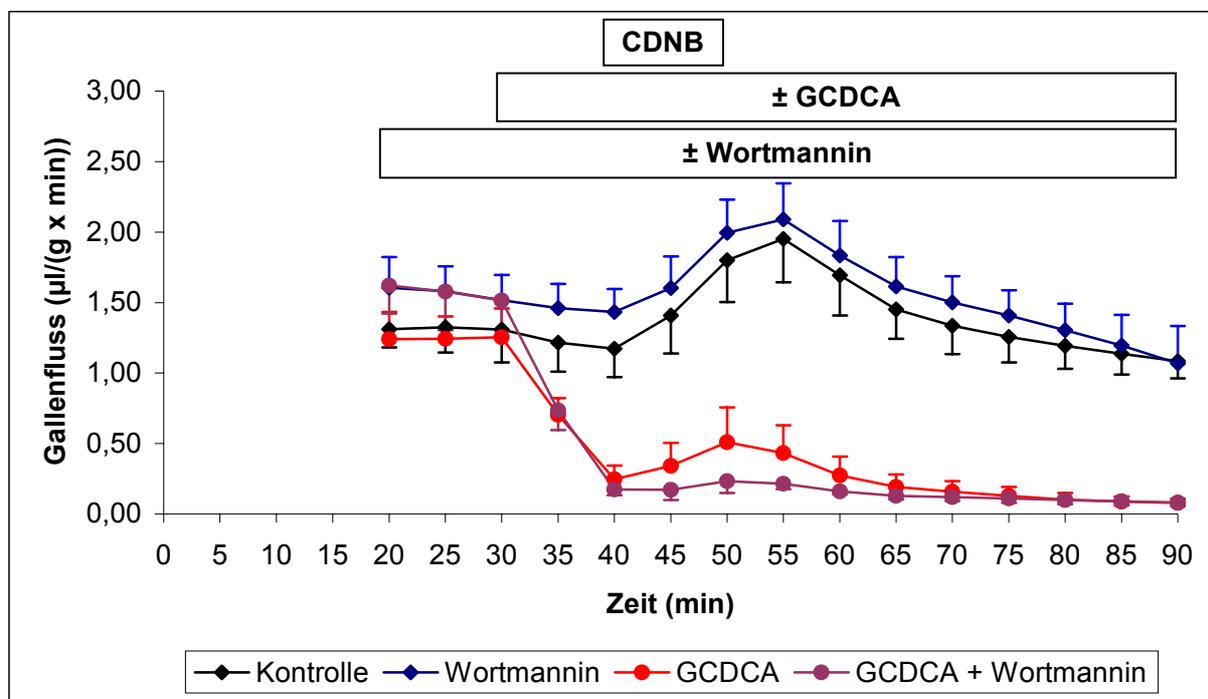
Die entsprechenden Kontrollversuche wurden bereits oben beschrieben (siehe Kap. **3.1.1.1.1**, S. 49, **Tabelle 2** und **Abbildung 9**).

3.1.2.1.2 GCDCA

Die Zugabe der hydrophoben Gallensäure GCDCA (**Gruppe G**) in einer Konzentration von 25 μM führte zu einer sehr starken Abnahme des Gallenflusses. Der cholestatische Effekt war dabei deutlich stärker ausgeprägt als bei Gabe der Gallensäure TCDCA (**Gruppe E**)

Unter Zugabe von Wortmannin (**Gruppe H**) schien sich der Gallenfluss noch weiter zu verringern, allerdings erreichten diese Veränderungen keine Signifikanz (siehe **Tabelle 8** und **Abbildung 17**).

Gruppe	G (GCDCA 25 μ M)	H (GCDCA 25 μ M + Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	Gallenfluss (μ l/(g x min))	Gallenfluss (μ l/(g x min))
20	1,24 \pm 0,19	1,62 \pm 0,20
25	1,24 \pm 0,16	1,58 \pm 0,27
30	1,26 \pm 0,20	1,51 \pm 0,21
35	0,70 \pm 0,12	0,74 \pm 0,14
40	0,25 \pm 0,10	0,17 \pm 0,04
45	0,34 \pm 0,16	0,17 \pm 0,07
50	0,51 \pm 0,25	0,23 \pm 0,08
55	0,43 \pm 0,20	0,21 \pm 0,02
60	0,27 \pm 0,13	0,16 \pm 0,02
65	0,19 \pm 0,09	0,13 \pm 0,02
70	0,16 \pm 0,08	0,12 \pm 0,03
75	0,13 \pm 0,06	0,11 \pm 0,03
80	0,10 \pm 0,05	0,10 \pm 0,03
85	0,09 \pm 0,04	0,09 \pm 0,03
90	0,08 \pm 0,03	0,08 \pm 0,03
Gesamtgallenfluss (μ l/(g x 50 min))	11,53 \pm 5,16	7,05 \pm 0,98

Tabelle 8: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA \pm Wortmannin(MW \pm SD, n = 6)Abbildung 17: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 25 μ M \pm Wortmannin 100 nM(MW \pm SD, n = 6)

Bei Verabreichung von GCDCA in halber Konzentration (12,5 μM , **Gruppe K**) zeigte die Gallensäure immer noch einen deutlichen cholestatischen Effekt, der allerdings signifikant niedriger ausfiel als unter Gabe von 25 μM GCDCA (**Gruppe G**) ($p < 0,01$).

Die zusätzliche Infusion von Wortmannin (**Gruppe L**) führte zu einer signifikanten Verringerung des Gallenflusses gegenüber alleingiger Gabe von GCDCA 12,5 μM ($p < 0,01$) (siehe **Tabelle 9** und **Abbildung 18**).

Gruppe	K (GCDCA 12,5 μM)	L (GCDCA 12,5 μM + Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	Gallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)	Gallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)
20	1,41 \pm 0,12	1,13 \pm 0,32
25	1,19 \pm 0,42	0,89 \pm 0,21
30	1,45 \pm 0,40	0,67 \pm 0,06
35	1,25 \pm 0,21	0,51 \pm 0,12
40	0,74 \pm 0,21	0,24 \pm 0,09
45	0,72 \pm 0,21	0,31 \pm 0,17
50	0,96 \pm 0,23	0,38 \pm 0,12
55	0,90 \pm 0,19	0,29 \pm 0,12
60	0,68 \pm 0,13	0,17 \pm 0,06
65	0,51 \pm 0,11	0,12 \pm 0,05
70	0,46 \pm 0,06	0,10 \pm 0,03
75	0,39 \pm 0,06	0,08 \pm 0,04
80	0,35 \pm 0,07	0,07 \pm 0,03
85	0,31 \pm 0,06	0,06 \pm 0,02
90	0,30 \pm 0,07	0,05 \pm 0,01
Gesamtgallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times 50 \text{ min})$)	27,94 \pm 4,54	8,16 \pm 3,04 *

Tabelle 9: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 12,5 μM \pm Wortmannin

(MW \pm SD, n = 3; * $p < 0,01$ vs. GCDCA 12,5 μM)

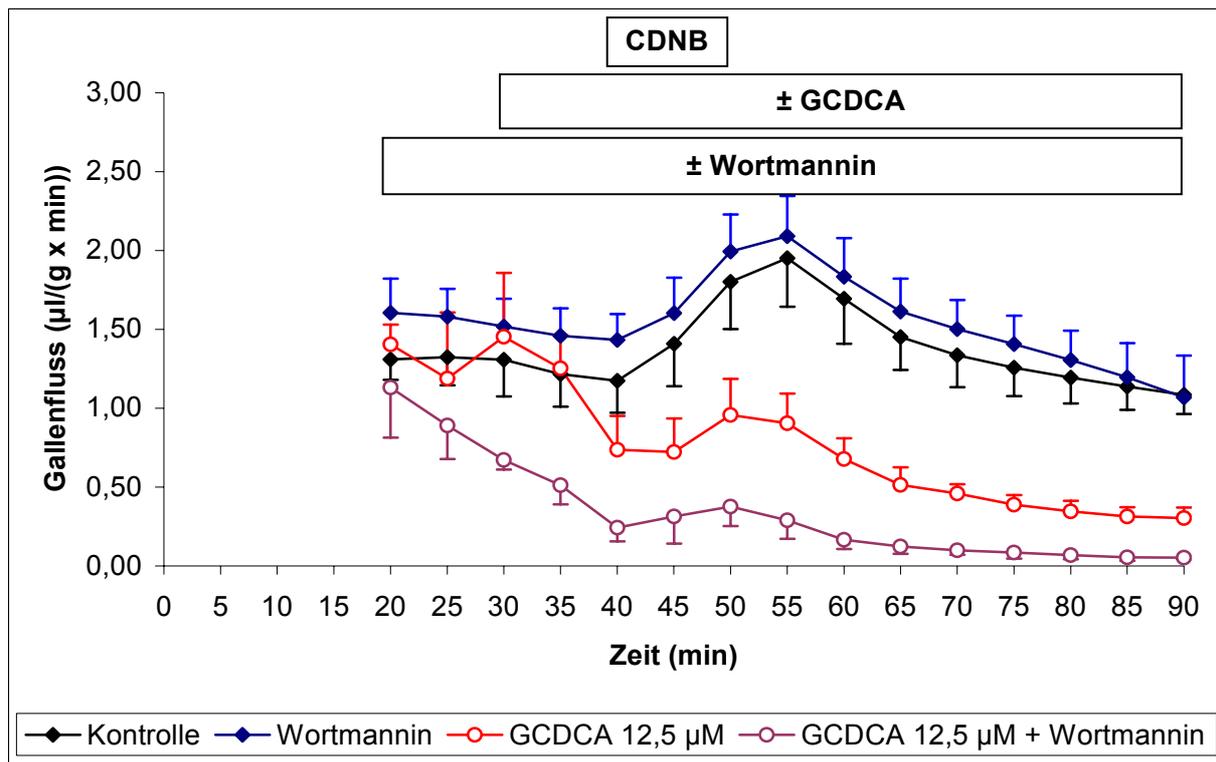


Abbildung 18: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 12,5 µM ± Wortmannin 100 nM
(MW ± SD, n = 3)

3.1.2.2 Biliäre Sekretion der Mrp2-Substrats GS-DNP

3.1.2.2.1 Kontrollen

Die Ergebnisse der entsprechenden Kontrollversuche wurden bereits oben beschrieben (siehe **Kap. 3.1.1.2.1**, S. 52, **Tabelle 4** und **Abbildung 11**).

3.1.2.2.2 GCDCA

GCDCA 25 µM (**Gruppe G**) induzierte eine sehr starke Einschränkung der Transportkapazität des apikalen Transporters Mrp2. Der Maximalwert der GS-DNP-Sekretion (51. - 55. min) betrug lediglich $2,18 \pm 1,66$ nmol/(g Leber x min) gegenüber einem Wert von $43,83 \pm 6,73$ nmol/(g Leber x min) bei Kontrollen.

Die Zugabe von Wortmannin (**Gruppe H**) hatte ein weiteres signifikantes Absinken der Sekretionsrate zur Folge (siehe **Tabelle 10** und **Abbildung 19**).

Gruppe	G (GCDCA 25 μ M)	H (GCDCA 25 μ M + Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
40	0 \pm 0	0 \pm 0
45	0,00 \pm 0,15	0,00 \pm 0,07
50	0,93 \pm 1,10	0,00 \pm 0,06
55	2,18 \pm 1,66	0,13 \pm 0,27
60	1,53 \pm 1,01	0,29 \pm 0,12
65	1,05 \pm 0,35	0,25 \pm 0,10
70	0,66 \pm 0,15	0,19 \pm 0,07
75	0,58 \pm 0,31	0,13 \pm 0,10
80	0,48 \pm 0,35	0,06 \pm 0,08
85	0,34 \pm 0,21	0,11 \pm 0,18
90	0,19 \pm 0,16	0,04 \pm 0,10
GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x 50 min))	38,93 \pm 16,39	4,99 \pm 4,14 *

Tabelle 10: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von GCDCA \pm Wortmannin

(MW \pm SD, n = 6; * p < 0,01 vs. GCDCA)

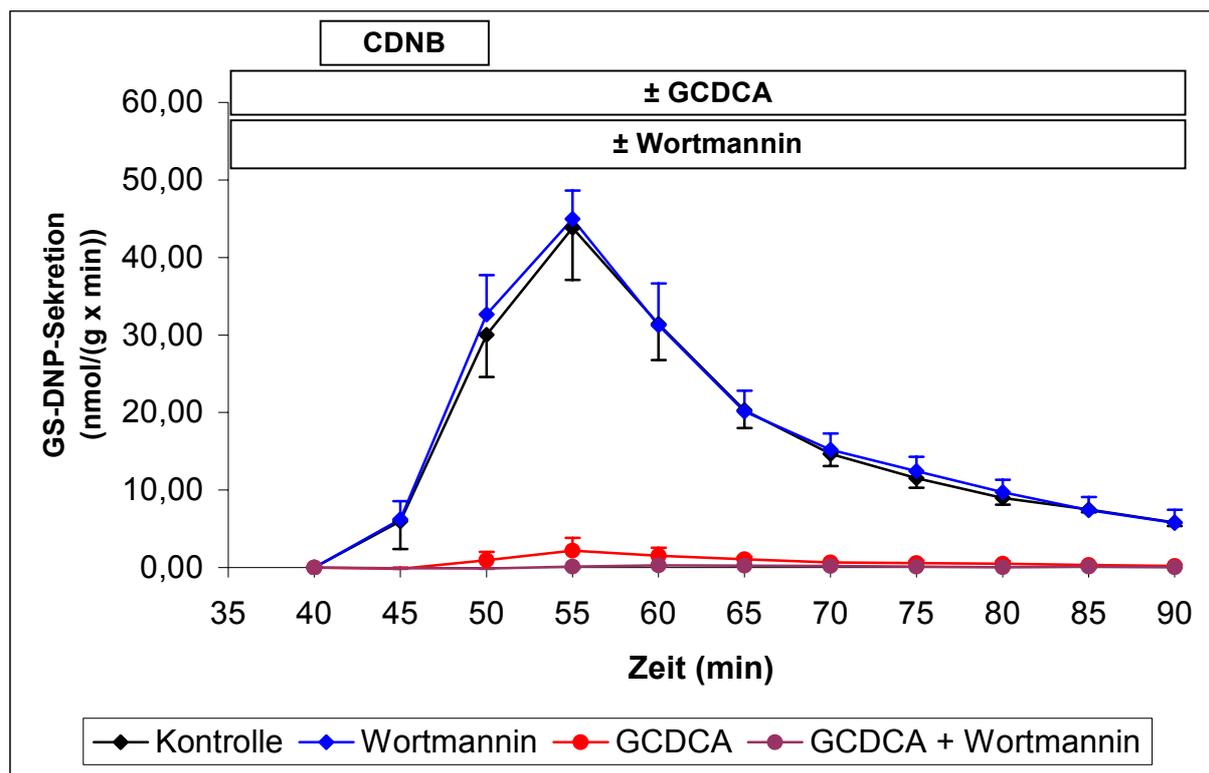


Abbildung 19: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von GCDCA 25 μ M \pm Wortmannin 100 nM

(MW \pm SD, n = 6)

Die Gabe von GCDCA in halber Konzentration (12,5 μM , **Gruppe K**) führte ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der GS-DNP-Sekretionsrate.

Die Zugabe von Wortmannin (**Gruppe L**) induzierte eine weitere signifikante Abnahme der Mrp2-Transportkapazität ($p < 0,05$) (siehe **Tabelle 11** und **Abbildung 20**).

Gruppe	K (GCDCA 12,5 μM)	L (GCDCA 12,5 μM + Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
40	0 \pm 0	0 \pm 0
45	0,86 \pm 0,71	0,10 \pm 0,44
50	10,13 \pm 4,97	4,14 \pm 3,97
55	13,82 \pm 5,30	5,79 \pm 4,58
60	7,77 \pm 2,71	3,20 \pm 1,79
65	3,78 \pm 1,59	2,57 \pm 0,65
70	2,68 \pm 0,54	1,47 \pm 0,22
75	1,54 \pm 0,37	0,99 \pm 0,33
80	1,03 \pm 0,24	0,76 \pm 0,55
85	0,74 \pm 0,18	0,33 \pm 0,19
90	0,53 \pm 0,18	0,22 \pm 0,21
GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x 50 min))	214,49 \pm 80,53	97,84 \pm 57,83 *

Tabelle 11: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von GCDCA 12,5 μM \pm Wortmannin

(MW \pm SD, n = 3; * $p < 0,05$ vs. GCDCA 12,5 μM)

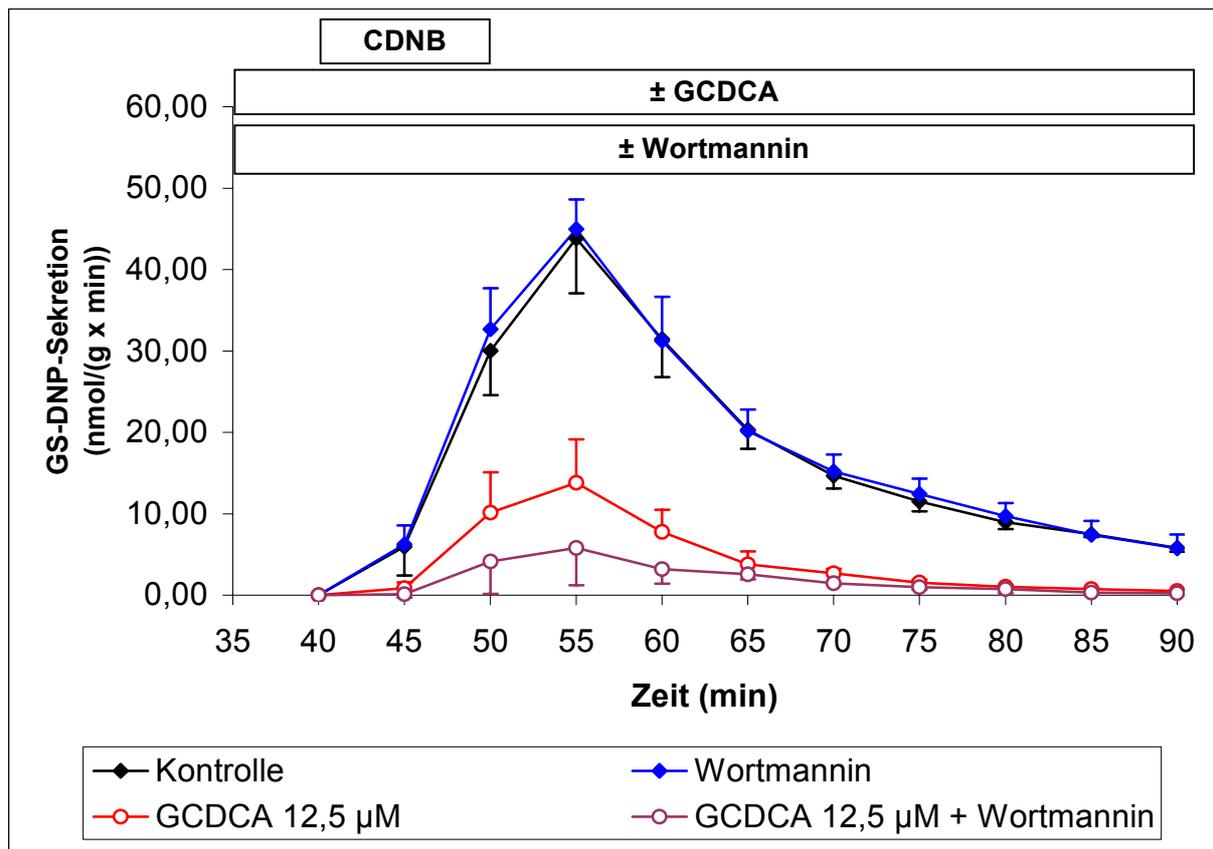


Abbildung 20: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von GCDCA 12,5 µM ± Wortmannin 100 nM

(MW ± SD, n = 3)

3.1.2.3 Aktivität der LDH und der GPT im hepatovenösen Effluat

Aktivität der LDH im hepatovenösen Effluat

Wie bereits beschrieben, fiel die LDH-Aktivität bei den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) sowie nach Zugabe von Wortmannin (**Gruppe B**) über die gesamte Versuchsdauer hinweg niedrig aus (siehe **Kap. 3.1.1.3**, S. 55).

Die Infusion von GCDCA 25 µM (**Gruppe G**) induzierte einen extrem starken Anstieg der LDH-Aktivität im Effluat, der zur 85. min mehr als das 6-fache der Gabe des Taurinkonjugats (**Gruppe E**) ausmachte.

Unter zusätzlicher Hemmung der PI₃-Kinasen mittels Wortmannin (**Gruppe H**) war zur 45. min zunächst eine signifikant stärkere LDH-Abgabe durch die Hepatozyten zu verzeichnen. Mit fortlaufender Perfusionsdauer näherte sie sich den Werten der

alleinigen GCDCA 25 μ M-Gabe (**Gruppe G**) an und lag gegen Ende (85. min) schließlich sogar signifikant unterhalb des entsprechenden Vergleichswertes (siehe **Tabelle 12** und **Abbildung 21**).

Versuchsgruppe	LDH - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
A Kontrolle	1,3 \pm 0,7	0,8 \pm 0,4	0,9 \pm 0,7	1,1 \pm 1,0
B Wortmannin 100 nM	1,0 \pm 0,6	1,0 \pm 0,5	0,8 \pm 0,5	3,0 \pm 4,9
G GCDCA 25 μ M	3,5 \pm 4,3	32,7 \pm 12,7 ^a	207,7 \pm 85,4 ^a	455,1 \pm 139,3 ^a
H GCDCA 25 μ M + Wortmannin 100 nM	3,0 \pm 2,3	129,9 \pm 47,9 ^b	223,2 \pm 30,7	279,4 \pm 85,9 ^c

Tabelle 12: Effekt von GCDCA \pm Wortmannin auf die LDH-Aktivität

(MW \pm SD, n = 6; ^a p < 0,01 vs. **Kontrolle**; ^b p < 0,01 vs. **GCDCA**;
^c p < 0,05 vs. **GCDCA**)

Aktivität der GPT im hepatovenösen Effluat

Wie bereits beschrieben, waren unbehandelte Kontrollen (**Gruppe A**) und alleinige Gabe von Wortmannin (**Gruppe B**) durch geringe GPT-Aktivität über die gesamte Versuchsdauer gekennzeichnet (siehe **Kap. 3.1.1.3**, S. 55).

Auf die Applikation von GCDCA in einer Konzentration von 25 μ M (**Gruppe G**) hin erreichte der Leberzellschaden das höchste Niveau von allen Versuchsgruppen. Bei Zugabe von Wortmannin (**Gruppe H**) waren zunächst signifikant höhere GPT-Werte zu verzeichnen (45. min), gegen Ende der Perfusionen (85. min) fiel die GPT-Aktivität jedoch signifikant geringer aus als unter alleiniger Infusion von GCDCA (siehe **Tabelle 13** und **Abbildung 21**). Damit verhielt sich die Entwicklung der GPT-Aktivität parallel zu derjenigen der LDH.

Versuchsgruppe	GPT - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
A Kontrolle	2,2 ± 1,9	1,1 ± 0,9	0,9 ± 1,4	2,1 ± 1,0
B Wortmannin 100 nM	0,9 ± 1,5	0,6 ± 0,9	0,1 ± 0,5	1,9 ± 3,9
G GCDCA 25 µM	1,2 ± 1,2	5,1 ± 2,0 ^a	35,4 ± 8,8 ^a	53,8 ± 6,1 ^a
H GCDCA 25 µM + Wortmannin 100 nM	2,5 ± 0,9	22,7 ± 7,6 ^b	31,6 ± 5,8	31,1 ± 10,0 ^b

Tabelle 13: Effekt von GCDCA ± Wortmannin auf die GPT-Aktivität

(MW ± SD, n = 6; ^a p < 0,01 vs. Kontrolle; ^b p < 0,01 vs. GCDCA)

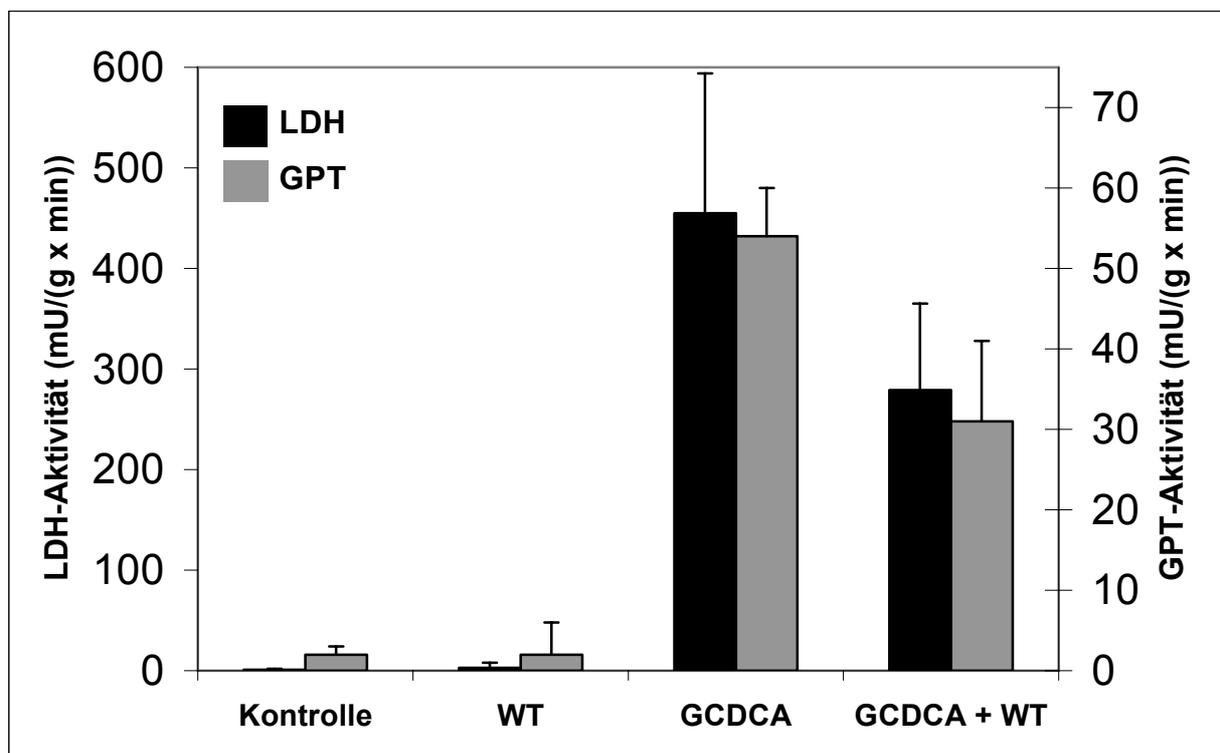


Abbildung 21: Effekt von GCDCA 25 µM ± Wortmannin 100 nM auf die Aktivität von LDH und GPT im Effluat zur 85. min

(MW ± SD, n = 6)

3.1.2.4 Aktivierte Caspase 3 und Zytokeratin 18-Filament im Lebergewebe

Die Rate apoptotischer Zellen war bei den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) und Gabe von Wortmannin (**Gruppe B**) minimal (siehe **Kap. 3.1.1.4**, S.57).

Mit GCDCA perfundierte Lebern (**Gruppe G**) zeigten ausgedehnte Areale apoptotischer Zellen. Eine eindeutige Zuordnung gemäß zonaler Gesichtspunkte (Zone 1, periportal; Zone 2, intermediär; Zone 3, perizentral) war nicht erkennbar. Die apoptotischen Areale waren vielmehr diffus und ohne erkennbares Muster verteilt. Der extensive Zelluntergang machte eine verlässliche Quantifizierung der Apoptoserate schwierig. Gegenüber TCDCA (**Gruppe E**) war das Ausmaß an Apoptose etwa 100-fach gesteigert.

Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe H**) verringerte diesen Zellschaden im Mittel sehr deutlich (siehe **Abbildung 22**), wobei innerhalb der 6 verschiedenen Perfusionsexperimente dieser Reihe allerdings große Unterschiede zu verzeichnen waren.

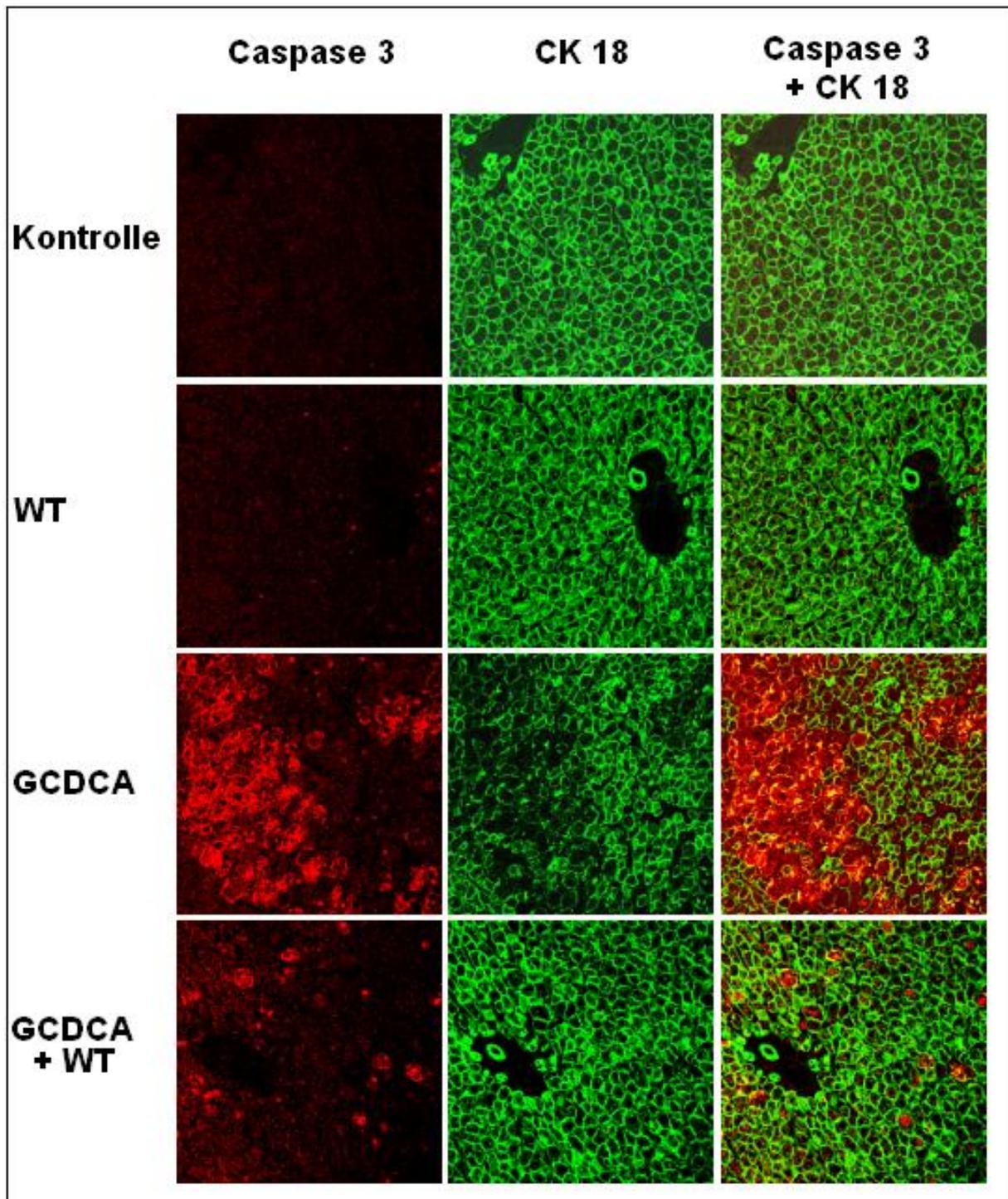


Abbildung 22: Effekt von GCDCA 25 μ M \pm Wortmannin 100 nM auf die aktivierte Caspase 3 und das Zytokeratin 18-Filamentnetzwerk im Lebergewebe

(Darstellung repräsentativer Areale in 250-facher Vergrößerung)

3.1.2.5 Phosphorylierung der PKB

GCDCA (**Gruppe G**) schien die PKB/Akt-Aktivität tendenziell leicht zu verstärken (auf ca. 160 % der Werts bei Kontrollen), und die Zugabe von Wortmannin (**Gruppe H**) schien diesen Effekt aufzuheben (siehe **Abbildung 23**). Allerdings erreichten diese Veränderungen keine statistische Signifikanz.

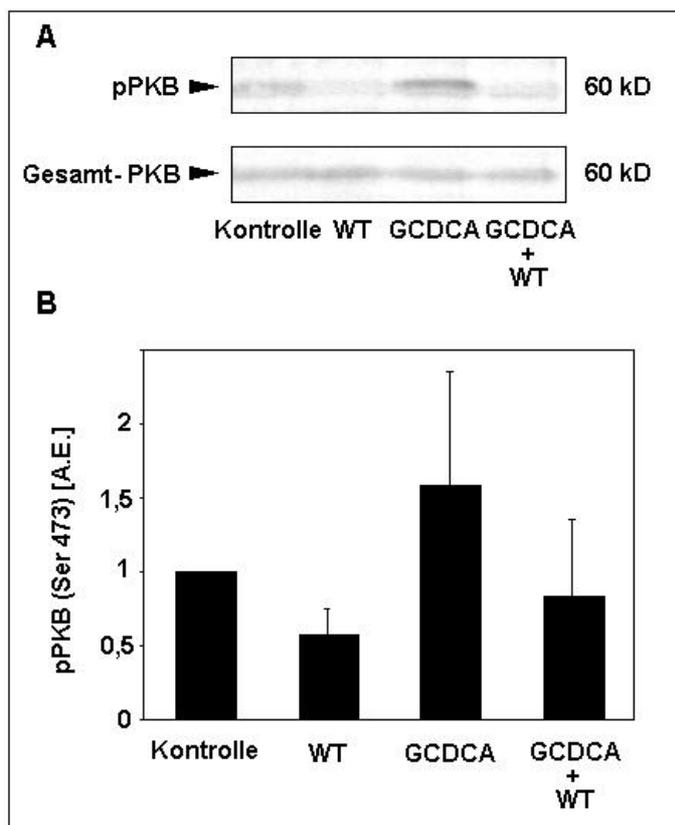


Abbildung 23:

Effekt von GCDCA 25 µM ± Wortmannin 100 nM auf die Aktivierung der PKB im Lebergewebe

A) Repräsentativer Immunoblot:
obere Banden: pPKB (Ser-473)
untere Banden: Gesamt-PKB

B) Densitometrie: pPKB im Lebergewebe:
(MW ± SD, n = 6)

3.1.2.6 Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat

Nach alleiniger Gabe von 25 μM GCDCA (**Gruppe G**) wurden im hepatovenösen Effluat zur 65. min $3,8 \pm 1,0$ $\mu\text{mol/l}$ Gallensäuren gaschromatographisch detektiert. Die Zugabe von Wortmannin (**Gruppe H**) verstärkte den Gallensäuren-Efflux tendentiell ($7,1 \pm 3,3$ $\mu\text{mol/l}$), allerdings nicht signifikant (siehe **Abbildung 24**).

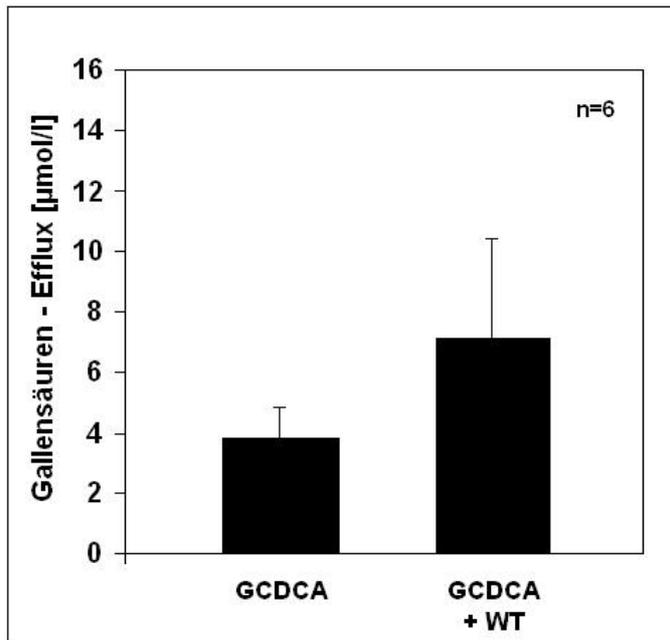


Abbildung 24:

Effekt von GCDCA 25 μM \pm Wortmannin 100 nM auf den hepatovenösen Gallensäuren - Efflux

(MW \pm SD, n = 6)

3.2 Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung und deren Modulation durch Sulfasalazin

3.2.1 Untersuchungen im Modell der humanen Hepatomzelllinie HepG2

Eine humane HepG2-Hepatomzelllinie wurde stabil mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfiziert. Apoptose wurde über Messung der Caspase 3-Aktivität mittels des fluoreszierenden Substrats Z-DEVD-R110 quantifiziert beziehungsweise über eine immunzytochemische Darstellung der aktivierten Caspase 3 erfasst. Die Gallensäureaufnahme wurde radiochemisch unter Verwendung von [³H]-Taurocholsäure bestimmt. Die NF-κB-Aktivität wurde über einen Reporter-gen-Assay ermittelt.

3.2.1.1 Apoptose

Zellen einer mit dem Gallensäuretransporter Ntcp transfizierten humanen Hepatomzelllinie (HepG2-Ntcp) bzw. nichttransfizierte Zellen der gleichen Zelllinie (HepG2) wurden über 4 Stunden mit den hydrophoben Gallensäuren TCDCA oder GCDCA, mit Sulfasalazin oder dessen Spaltprodukten Sulfapyridin und 5-ASA inkubiert.

3.2.1.1.1 Effekte der hydrophoben Gallensäuren TCDCA und GCDCA

Caspase-Assay:

TCDCA induzierte in aufsteigender Konzentration (25 µM, 50 µM und 75 µM) in zunehmendem Maß Apoptose in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen. Die Stimulation der Zellen mit GCDCA führte ebenfalls zu einer dosisabhängigen, jedoch im Vergleich mit TCDCA deutlich stärkeren Zunahme der Caspase 3-Aktivität.

Die Zugabe des Pancaspase-Inhibitors ZVAD-FMK (20 µM) konnte die von GCDCA 75 µM ausgelöste Caspase 3-Aktivität bis auf Kontrollniveau drücken (siehe **Abbildung 25**).

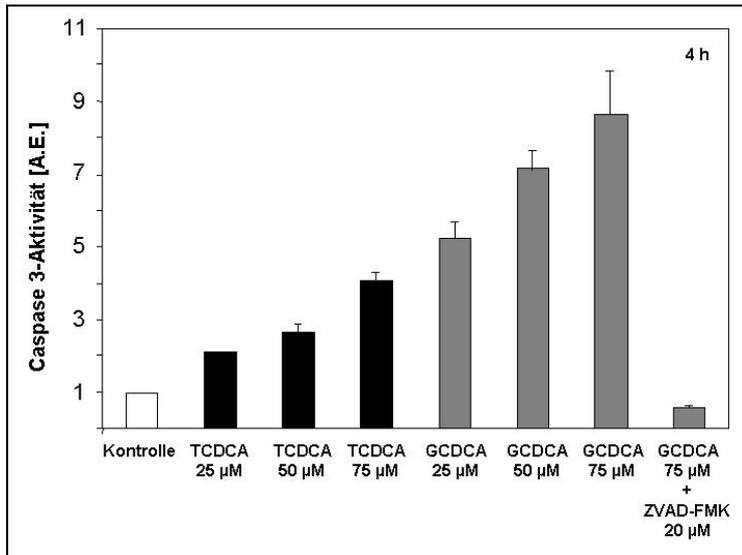


Abbildung 25:

Effekte von TCDCA bzw. GCDCA auf die Caspase 3-Aktivität im Zelllysat Ntcp-transfizierter HepG2-Zellen

(MW ± SD, n = 3)

In den nicht mit Ntcp transfizierten HepG2-Zellen hatten die Gallensäuren keinen Einfluss auf die Caspase 3/7-Aktivität (siehe **Abbildung 26**). Eine Aufnahme in die Leberzellen scheint somit Voraussetzung für die toxische Wirkung von GCDCA in den verwendeten niedrigen Konzentrationen zu sein.

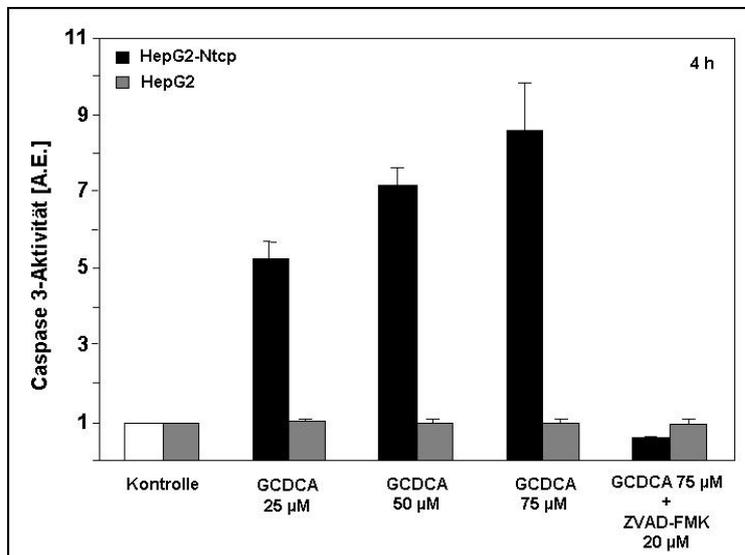


Abbildung 26:

Effekt von GCDCA auf die Caspase 3-Aktivität in Ntcp-transfizierten bzw. nicht-transfizierten HepG2-Zellen

(MW ± SD, n = 3)

3.2.1.1.2 Effekt von Sulfasalazin auf die Gallensäuren-induzierte Apoptose

Caspase-Assay:

Die alleinige Gabe von Sulfasalazin 1000 μM zeigte gegenüber Kontrolle keine Veränderung der Caspase 3-Aktivität.

Das nach Stimulation der Zellen mit GCDCA 75 μM zu verzeichnende Ausmaß an Apoptose wurde durch gleichzeitige Gabe von Sulfasalazin dosisabhängig gehemmt: In einer Dosierung von 1 μM hatte die Zugabe von Sulfasalazin zwar noch keinen sichtbaren Effekt, unter Gabe von 10 μM war eine leichte antiapoptotische Wirkung jedoch schon zu verzeichnen. Die Applikation von 100 μM Sulfasalazin reduzierte die Caspase 3-Aktivität sehr deutlich, und eine Konzentration von 1000 μM führte schließlich zu einer Verringerung der Apoptoserate bis auf Kontrollniveau (siehe **Abbildung 27**).

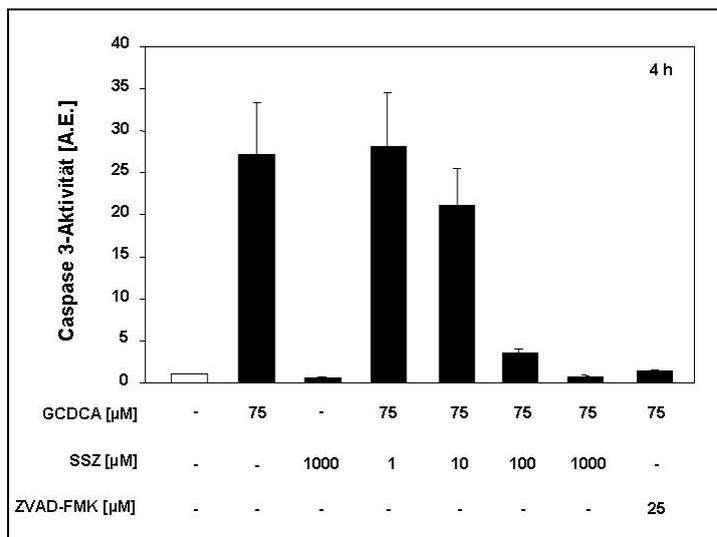


Abbildung 27:

Effekt von Sulfasalazin auf die GCDCA-induzierte Apoptose: Caspase-Assay

(MW \pm SD, n = 3)

Immunzytochemische Darstellung der aktivierten Caspase 3:

Bei den unstimulierten Kontrollen fanden sich nur vereinzelt Caspase 3-positive Zellen. Ein vergleichbares Bild fand sich nach Gabe von Sulfasalazin 1000 μM (ca. $1 \pm 0,5$ %).

Bei alleiniger Stimulation der Zellen mit GCDCA über 4 Stunden zeigte sich eine relativ hohe Anzahl apoptotischer Zellen (ca. 23 ± 6 %).

Die Zugabe von Sulfasalazin führte zu einer dosisabhängigen Reduktion Caspase 3-positiver Zellen. So fand sich bei Zugabe einer Sulfasalazinkonzentration von 100 μM

eine Halbierung der Caspase 3-positiven Zellen (11 ± 1 %) gegenüber alleiniger GCDCA-Stimulation. Bei Zugabe von $1000 \mu\text{M}$ Sulfasalazin betrug die Apoptoserate sogar nur noch 2 ± 1 % (siehe **Abbildung 28**).

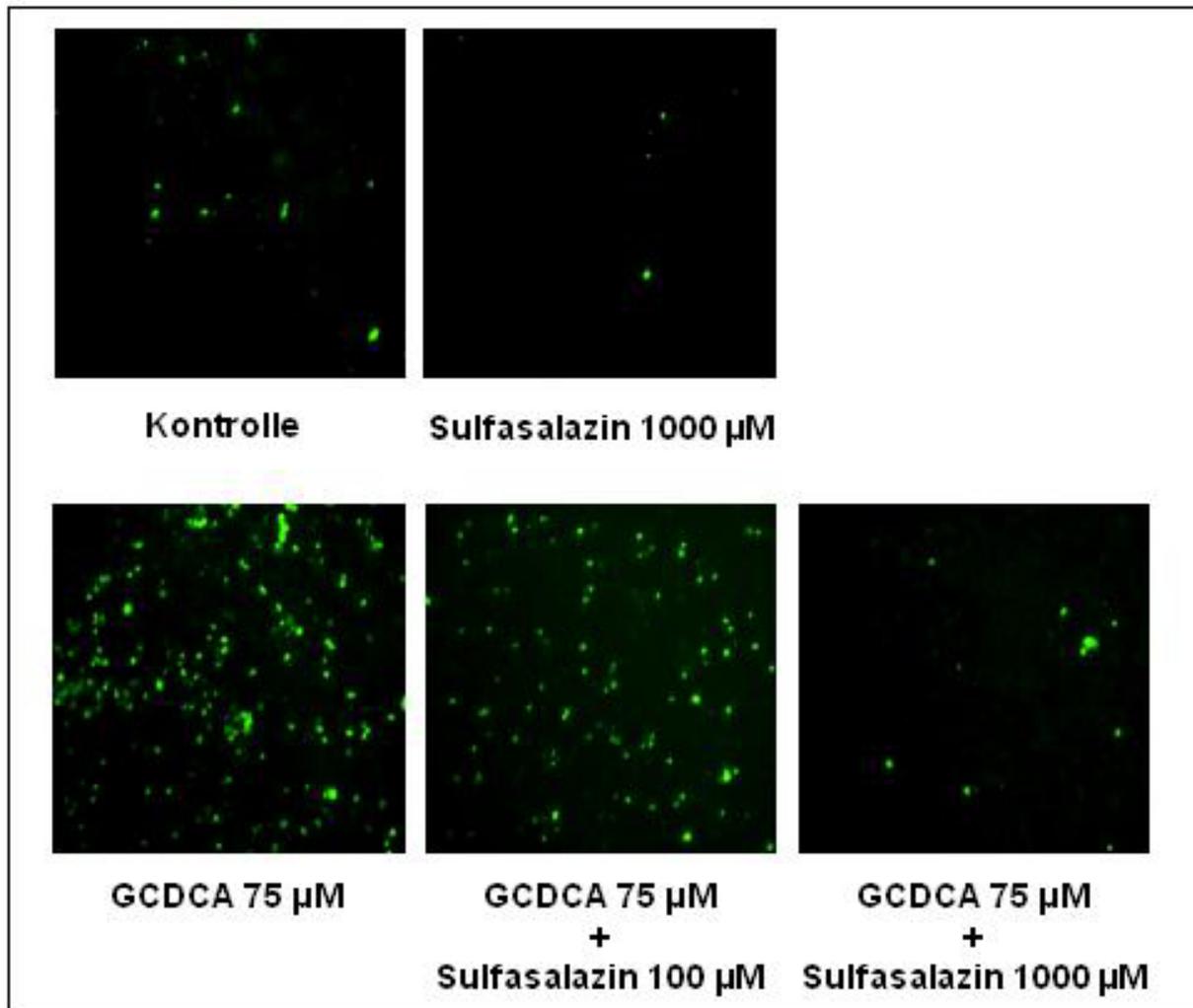


Abbildung 28: Effekt von Sulfasalazin auf die GCDCA-induzierte Apoptose: Immunzytochemische Darstellung Caspase 3-positiver HepG2-Zellen

(Darstellung repräsentativer Bildausschnitte in 100-facher Vergrößerung)

3.2.1.1.3 Effekte der Sulfasalazin-Spaltprodukte 5-ASA und Sulfapyridin auf die Gallensäuren-induzierte Apoptose

Im Caspase-Assay zeigte die Gabe von 5-Aminosalizylsäure in gleicher Konzentration wie bei den zuvor gezeigten Sulfasalazin-Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die GCDCA-induzierte Apoptose (siehe **Abbildung 29**).

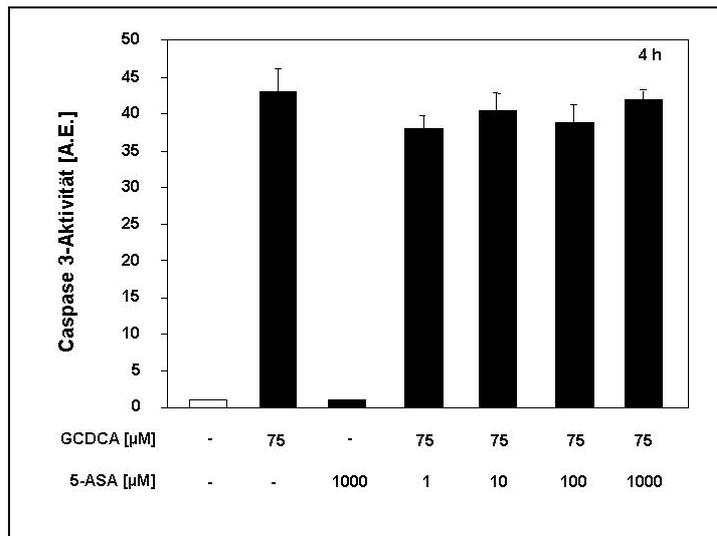


Abbildung 29:

Effekt von 5-ASA auf die GCDCA-induzierte Apoptose: Caspase-Assay

(MW ± SD, n = 3)

Analog durchgeführte Experimente mit Sulfapyridin zeigten ebenfalls keinen Effekt auf die Apoptoserate der mit GCDCA stimulierten Zellen (siehe **Abbildung 30**).

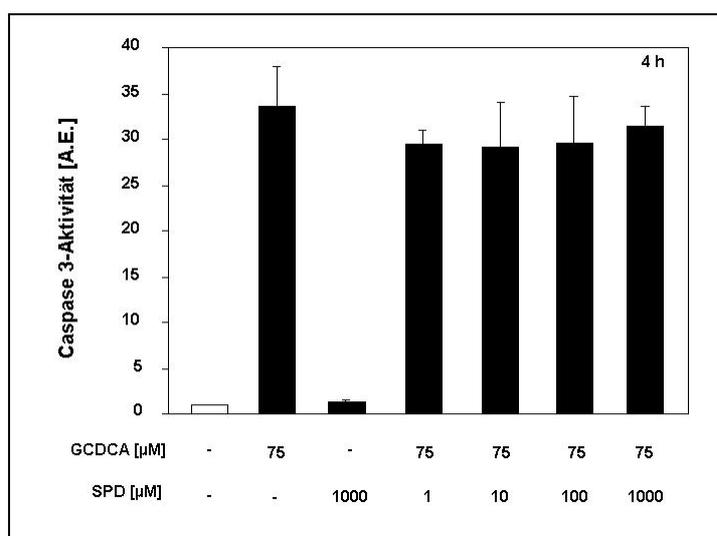


Abbildung 30:

Effekt von Sulfapyridin auf die GCDCA-induzierte Apoptose: Caspase-Assay

(MW ± SD, n = 3)

3.2.1.1.4 Effekt von Sulfasalazin auf die TNF- α /Actinomycin D-vermittelte Apoptose

Parallel zu den Versuchen mit Gallensäurenbehandlung wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Induktion der Apoptose durch die kombinierte Gabe von TNF- α (28 ng/ml) und Actinomycin D (0,2 μ g/ml) erzielt wurde.

Die zusätzliche Applikation von Sulfasalazin in verschiedenen Konzentrationen zeigte in Analogie zu den Versuchen mit GCDCA eine Hemmung der Apoptose in Abhängigkeit von der Dosis. Dabei führte die Gabe von Sulfasalazin 1000 μ M zur stärksten Reduktion der Caspase 3-Aktivität, 100 μ M hatten einen etwas geringeren Effekt, während die Gabe von 10 μ M bzw. 1 μ M keinen erkennbaren Einfluss hatten (siehe **Abbildung 31**).

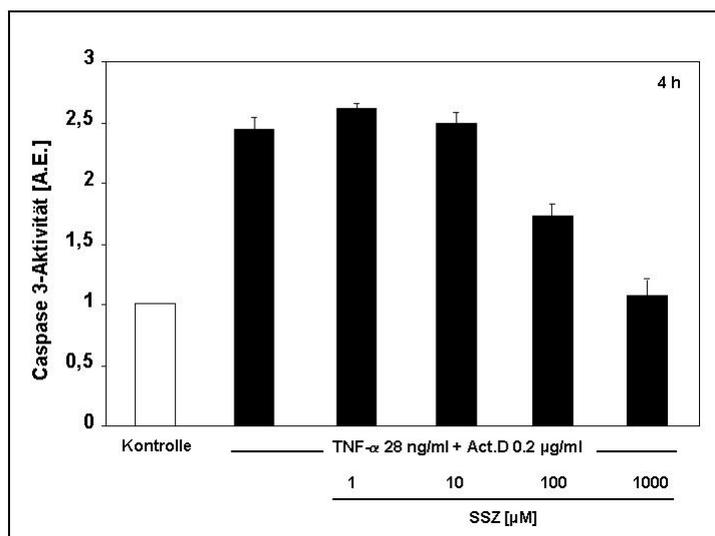


Abbildung 31:

Effekt von Sulfasalazin auf die TNF- α /Actinomycin D (Act.D)-induzierte Apoptose: Caspase-Assay
(MW \pm SD, n = 3)

3.2.1.2 Gallensäureaufnahme

Die Gallensäureaufnahme wurde unter Verwendung der radiochemisch markierten Gallensäure [^3H]-Taurocholsäure bestimmt. HepG2-Ntcp Zellen wurden mit dieser und verschiedenen Konzentrationen an Sulfasalazin, 5-Aminosalizylsäure oder Sulfapyridin inkubiert.

Sulfasalazin zeigte in aufsteigender Dosierung eine zunehmende Hemmung der Gallensäureaufnahme, wobei die Gabe von 100 μM bereits eine Reduktion auf ca. 70 %, die Gabe von 1000 μM auf ca. 30 % gegenüber Kontrollen bewirkte.

Die Sulfasalazin-Spaltprodukte 5-Aminosalizylsäure und Sulfapyridin dagegen hatten keinen Einfluss auf die Gallensäureaufnahme (siehe **Abbildung 32**).

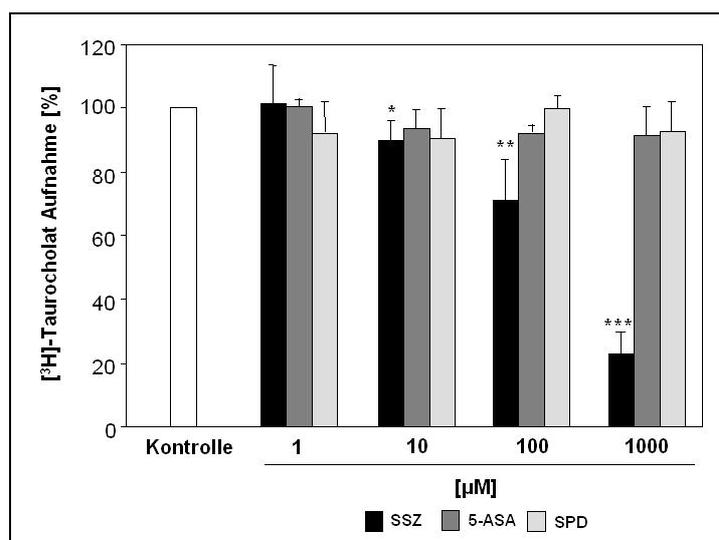


Abbildung 32:

Einfluss von Sulfasalazin und seinen Spaltprodukten auf die Aufnahme von [^3H]-Taurocholat durch Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen

(MW \pm SD, n = 3; * p < 0,01; ** p < 0,005; *** p < 0,001 vs. Kontrolle)

3.2.1.3 NF- κ B-Aktivität

HepG2-Ntcp Zellen wurden mit Tk-Ren-CMV und einem Firefly NF- κ B Reporter Plasmid (Luc-NF- κ B) bzw. einem als Kontrolle dienenden Firefly Plasmid (Luc-leer) kotransfiziert und in verschiedenen Konzentrationen mit Sulfasalazin, GCDCA oder einer Kombination der beiden Substanzen stimuliert. Die Werte für Firefly Luciferase wurden auf die Messwerte für Renilla Luciferase normalisiert, um die Schwankungen in der Transfektionseffizienz auszugleichen.

Bei den mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen blieb das gemessene Luciferasesignal über alle Versuchsgruppen hinweg auf konstantem Niveau.

Die Luc-NF- κ B-transfizierten Zellen zeigten folgendes Verhalten:

Alleinige Gabe von GCDCA 75 μ M führte zu keiner Erhöhung der NF- κ B-Aktivität.

Sulfasalazin dagegen bewirkte mit aufsteigender Dosierung eine zunehmende Aktivierung von NF- κ B. Bereits 10 μ M Sulfasalazin führte zu einer signifikanten Steigerung des NF- κ B-Luciferasesignals auf 158 % der Kontrolle. 100 μ M bewirkten eine Erhöhung auf 199 % und 1000 μ M auf 433 % (siehe **Abbildung 33**).

Bei gemeinsamer Gabe von GCDCA 75 μ M und Sulfasalazin in aufsteigender Konzentration fand sich keine Veränderung gegenüber den Versuchsgruppen alleiniger Sulfasalazin-Stimulation (siehe **Abbildung 33**).

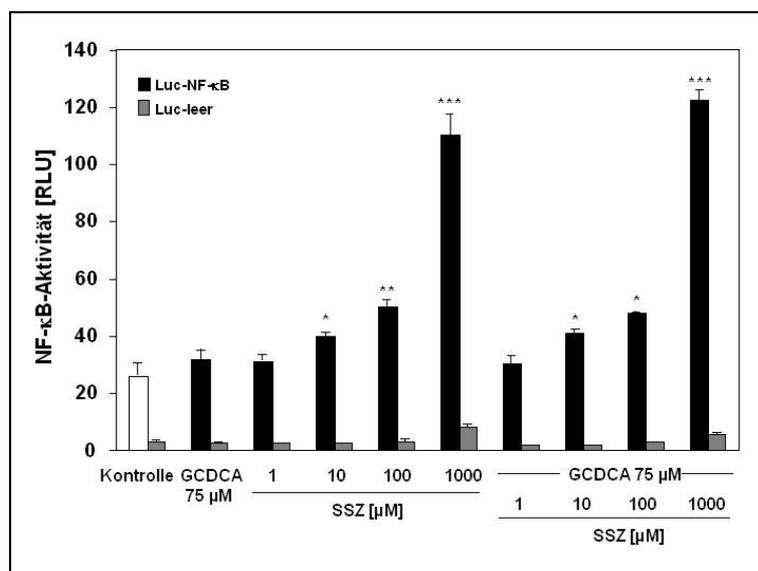


Abbildung 33:

Effekt von Sulfasalazin auf die Aktivität von NF- κ B im Luciferase - Reportergen - Assay

(MW \pm SD, n = 3; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs. Kontrolle)

3.2.2 Untersuchungen im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Rattenlebern wurden isoliert über 90 min mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Glycochenodeoxycholsäure wurde in einer Konzentration von 25 μM bzw. 12,5 μM isoliert oder in Kombination mit Sulfasalazin appliziert. Eine Hemmung der PI_3 -Kinasen wurde in zusätzlichen Versuchsreihen abermals mit Wortmannin durchgeführt (siehe **Abbildung 7** und **Tabelle 1**). Von der 41. bis zur 50. min wurde das organische Modellanion CDNB infundiert. Allerdings gelang eine verlässliche Erfassung des GS-DNP-Transports in die Galle aufgrund einer Interferenz mit der Eigenabsorption des Sulfasalazins in dem photometrischen Test nicht.

3.2.2.1 Gallenfluss

3.2.2.1.1 Kontrollen

Die Versuchsreihen der unbehandelten Kontrollen und der alleinigen Wortmannin-Gabe wurden bereits beschrieben (siehe **Kap. 3.1.1.1.1**, S. 49, dort auch **Tabelle 2** und **Abbildung 9**).

Die Gabe von Sulfasalazin (**Gruppe C**) führte zu einer Abnahme des Gallenflusses. Der Gesamtgallenfluss über 50 min betrug $43,67 \pm 7,34 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ und war somit im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) mit einem Wert von $71,45 \pm 10,45 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ signifikant erniedrigt ($p < 0,01$).

Unter der gemeinsamen Gabe von Sulfasalazin und Wortmannin (**Gruppe D**) zeigte sich eine weitere Reduktion des Gallenflusses, die gegenüber der alleinigen Infusion von Sulfasalazin (**Gruppe C**) ebenfalls signifikant war ($p < 0,01$).

In beiden Versuchsreihen (**Gruppe C** und **Gruppe D**) blieb der vorübergehende Anstieg des Gallenflusses nach Applikation von CDNB aus (siehe **Tabelle 14** und **Abbildung 34**).

Gruppe	C (Sulfasalazin 100 µM)	D (Sulfasalazin 100 µM + Wortmannin 100 nM)
Zeit (min)	Gallenfluss (µl/(g x min))	Gallenfluss (µl/(g x min))
20	1,36 ± 0,24	1,46 ± 0,33
25	1,23 ± 0,22	1,15 ± 0,15
30	0,94 ± 0,19	0,80 ± 0,09
35	0,86 ± 0,27	0,69 ± 0,09
40	0,89 ± 0,23	0,67 ± 0,11
45	0,94 ± 0,24	0,67 ± 0,11
50	0,92 ± 0,19	0,67 ± 0,15
55	0,91 ± 0,18	0,66 ± 0,18
60	0,98 ± 0,18	0,68 ± 0,24
65	1,00 ± 0,18	0,65 ± 0,26
70	0,97 ± 0,17	0,57 ± 0,27
75	0,91 ± 0,15	0,47 ± 0,26
80	0,83 ± 0,15	0,39 ± 0,25
85	0,71 ± 0,16	0,32 ± 0,23
90	0,57 ± 0,19	0,26 ± 0,22
Gesamtgallenfluss (µl/(g x 50 min))	43,67 ± 7,34	26,72 ± 10,21 *

Tabelle 14: Gallenfluss bei Gabe von Sulfasalazin ± Wortmannin

(MW ± SD, n = 6; * p < 0,01 vs. Sulfasalazin)

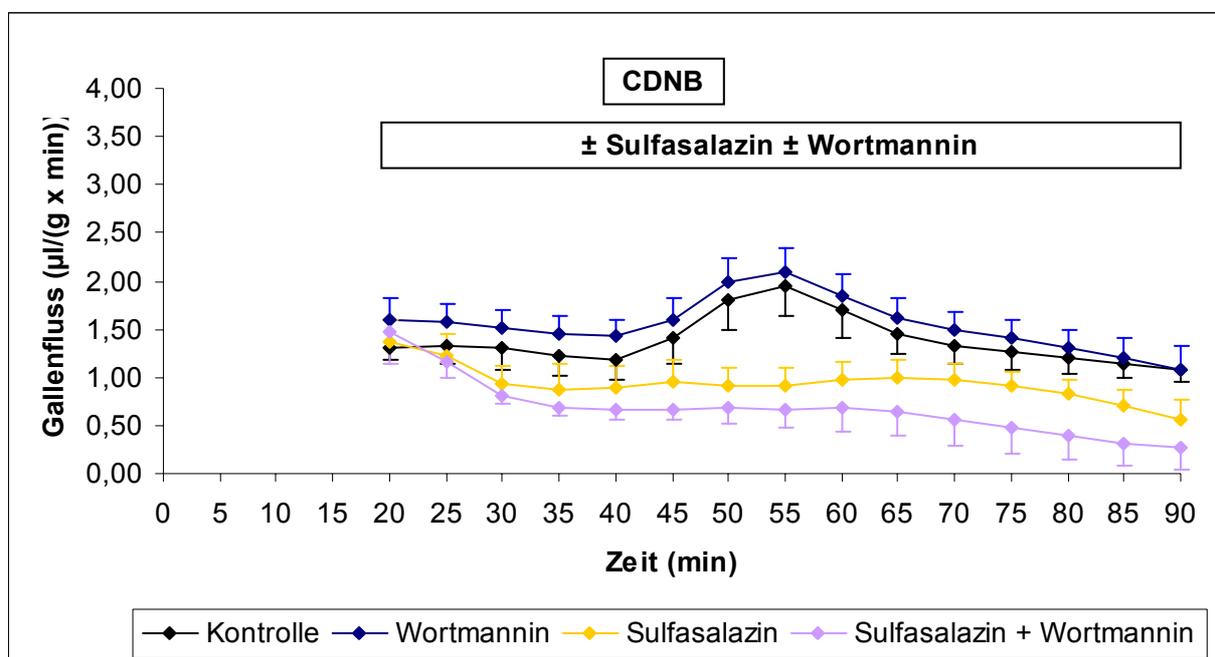


Abbildung 34: Gallenfluss bei Gabe von Sulfasalazin 100 µM ± Wortmannin 100 nM

(MW ± SD, n = 6)

3.2.2.1.2 Effekt von GCDCA

Die Effekte der Gabe von GCDCA in einer Konzentration von 25 μM (**Gruppe G**) bzw. 12,5 μM (**Gruppe K**) wurden bereits beschrieben (siehe **Kap. 3.1.2.1.2**, S. 61).

3.2.2.1.3 Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA und Sulfasalazin

Bei gemeinsamer Applikation von GCDCA 25 μM und Sulfasalazin (**Gruppe I**) konnten folgende Effekte beobachtet werden: Die Infusion Sulfasalazins zur 20. min zeigte analog zu den Ergebnissen der Versuche mit alleiniger Sulfasalazin-Gabe (**Gruppe C**) zunächst eine Abnahme des Gallenflusses. Nach Gabe der Gallensäure GCDCA zur 31. min erfolgte ein Anstieg des Gallenflusses bis fast auf Ausgangsniveau und nach der 45. min ein erneutes Absinken bis auf einen Wert von $0,73 \pm 0,23 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$ am Ende des Experiments. Der Gesamtgallenfluss betrug $56,55 \pm 14,35 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ und lag damit ca. um das Fünffache höher ($p < 0,01$) als bei alleiniger Gabe von GCDCA 25 μM (**Gruppe G**) (siehe **Tabelle 15** und **Abbildung 35**).

Gruppe	G (GCDCA 25 μ M)	I (GCDCA 25 μ M + Sulfasalazin 100 μ M)
Zeit (min)	Gallenfluss (μ l/(g x min))	Gallenfluss (μ l/(g x min))
20	1,24 \pm 0,19	1,63 \pm 0,17
25	1,24 \pm 0,16	1,34 \pm 0,19
30	1,26 \pm 0,20	0,98 \pm 0,17
35	0,70 \pm 0,12	1,16 \pm 0,31
40	0,25 \pm 0,10	1,42 \pm 0,31
45	0,34 \pm 0,16	1,50 \pm 0,30
50	0,51 \pm 0,25	1,38 \pm 0,30
55	0,43 \pm 0,20	1,22 \pm 0,37
60	0,27 \pm 0,13	1,20 \pm 0,36
65	0,19 \pm 0,09	1,15 \pm 0,39
70	0,16 \pm 0,08	1,19 \pm 0,31
75	0,13 \pm 0,06	1,08 \pm 0,33
80	0,10 \pm 0,05	0,98 \pm 0,30
85	0,09 \pm 0,04	0,87 \pm 0,25
90	0,08 \pm 0,03	0,73 \pm 0,23
Gesamtgallenfluss (μ l/(g x 50 min))	11,53 \pm 5,16	56,55 \pm 14,35 *

Tabelle 15: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 25 μ M \pm Sulfasalazin 100 μ M

(MW \pm SD, n = 6; * p < 0,01 vs. GCDCA)

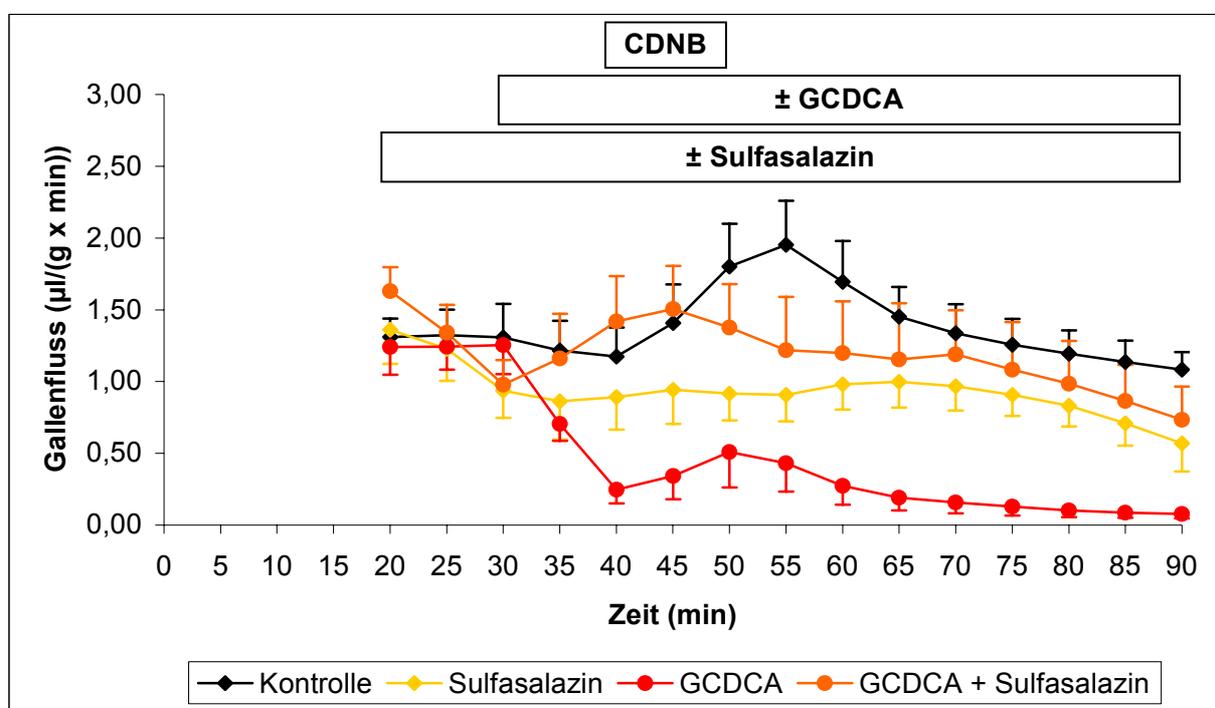


Abbildung 35: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 25 μ M \pm Sulfasalazin 100 μ M

(MW \pm SD, n = 6)

Der Gesamtgallenfluss bei gemeinsamer Gabe von 12,5 μM GCDCA und 100 μM Sulfasalazin (**Gruppe M**) lag bei $37,12 \pm 12,96 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$. Die Zugabe von Sulfasalazin führte also tendenziell zu einer Steigerung des Gallenflusses gegenüber alleiniger Infusion von GCDCA 12,5 μM (**Gruppe K**), der Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,15$) (siehe **Tabelle 16** und **Abbildung 36**).

Gruppe	K (GCDCA 12,5 μM)	M (GCDCA 12,5 μM + Sulfasalazin 100 μM)
Zeit (min)	Gallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)	Gallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)
20	$1,41 \pm 0,12$	$1,47 \pm 0,20$
25	$1,19 \pm 0,42$	$1,25 \pm 0,18$
30	$1,45 \pm 0,40$	$0,84 \pm 0,17$
35	$1,25 \pm 0,21$	$0,78 \pm 0,23$
40	$0,74 \pm 0,21$	$0,86 \pm 0,28$
45	$0,72 \pm 0,21$	$0,92 \pm 0,34$
50	$0,96 \pm 0,23$	$0,88 \pm 0,33$
55	$0,90 \pm 0,19$	$0,78 \pm 0,30$
60	$0,68 \pm 0,13$	$0,74 \pm 0,32$
65	$0,51 \pm 0,11$	$0,72 \pm 0,29$
70	$0,46 \pm 0,06$	$0,71 \pm 0,28$
75	$0,39 \pm 0,06$	$0,70 \pm 0,25$
80	$0,35 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,21$
85	$0,31 \pm 0,06$	$0,65 \pm 0,18$
90	$0,30 \pm 0,07$	$0,64 \pm 0,16$
Gesamtgallenfluss ($\mu\text{l}/(\text{g} \times 50 \text{ min})$)	$27,94 \pm 4,54$	$37,12 \pm 12,96$

Tabelle 16: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 12,5 μM \pm Sulfasalazin 100 μM

(MW \pm SD, n = 6)

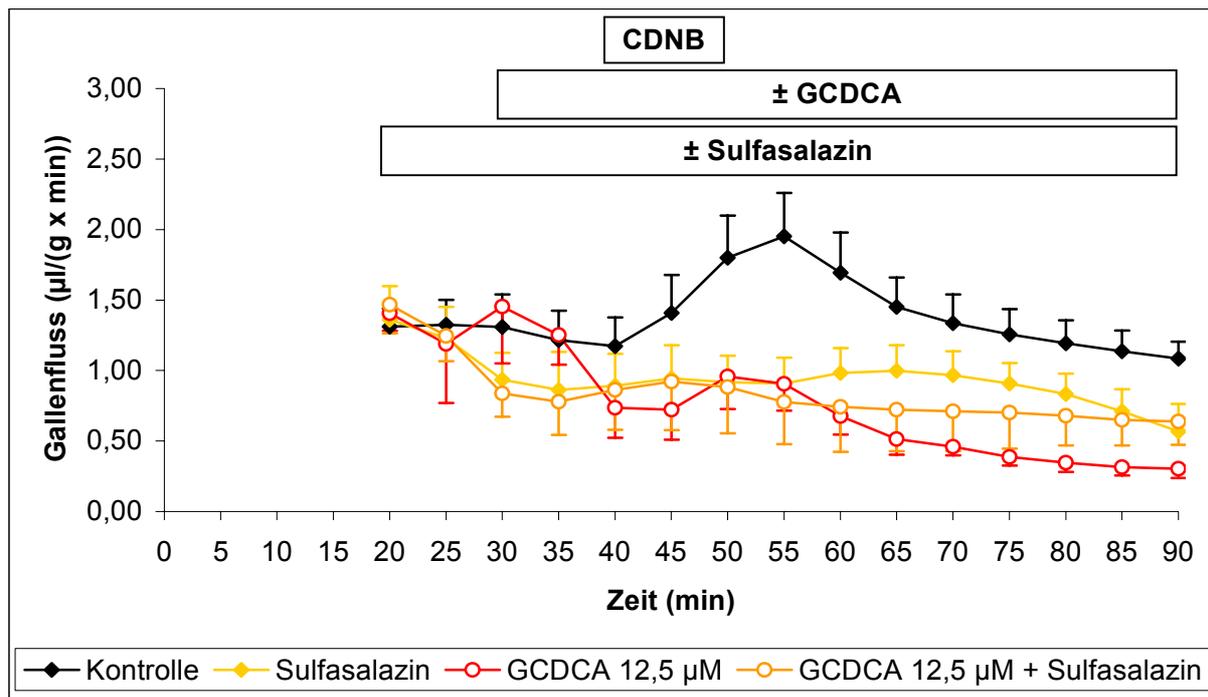


Abbildung 36: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 12,5 μM \pm Sulfasalazin 100 μM
(MW \pm SD, n = 6)

3.2.2.1.4 Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA, Sulfasalazin und Wortmannin

Unter Gabe von GCDCA 25 μM , Sulfasalazin und Wortmannin (**Gruppe J**) fand sich mit $25,94 \pm 3,27 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ ein signifikant höherer Gesamt-Gallenfluss als unter isolierter Infusion von GCDCA 25 μM ($p < 0,01$) (**Gruppe G**). Der anticholestatische Effekt der gemeinsamen Zugabe von Sulfasalazin und Wortmannin fiel jedoch deutlich geringer aus als derjenige der alleinigen Zugabe von Sulfasalazin (**Gruppe I**) ($p < 0,01$).

Gruppe	I (GCDCA 25 μ M + Sulfasalazin 100 μ M)	J (GCDCA 25 μ M + Wortmannin 100 nM + Sulfasalazin 100 μ M)
Zeit (min)	Gallenfluss (μ l/(g x min))	Gallenfluss (μ l/(g x min))
20	1,63 \pm 0,17	1,78 \pm 0,24
25	1,34 \pm 0,19	1,39 \pm 0,21
30	0,98 \pm 0,17	1,04 \pm 0,12
35	1,16 \pm 0,31	1,29 \pm 0,14
40	1,42 \pm 0,31	1,33 \pm 0,10
45	1,50 \pm 0,30	0,90 \pm 0,09
50	1,38 \pm 0,30	0,59 \pm 0,08
55	1,22 \pm 0,37	0,44 \pm 0,11
60	1,20 \pm 0,36	0,46 \pm 0,09
65	1,15 \pm 0,39	0,45 \pm 0,08
70	1,19 \pm 0,31	0,46 \pm 0,09
75	1,08 \pm 0,33	0,48 \pm 0,09
80	0,98 \pm 0,30	0,48 \pm 0,09
85	0,87 \pm 0,25	0,48 \pm 0,09
90	0,73 \pm 0,23	0,45 \pm 0,08
Gesamtgallenfluss (μ l/(g x 50 min))	56,55 \pm 14,35	25,94 \pm 3,27 *

Tabelle 17: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 25 μ M und Sulfasalazin \pm Wortmannin

(MW \pm SD, n = 6; * p < 0,01 vs. GCDCA 25 μ M + Sulfasalazin)

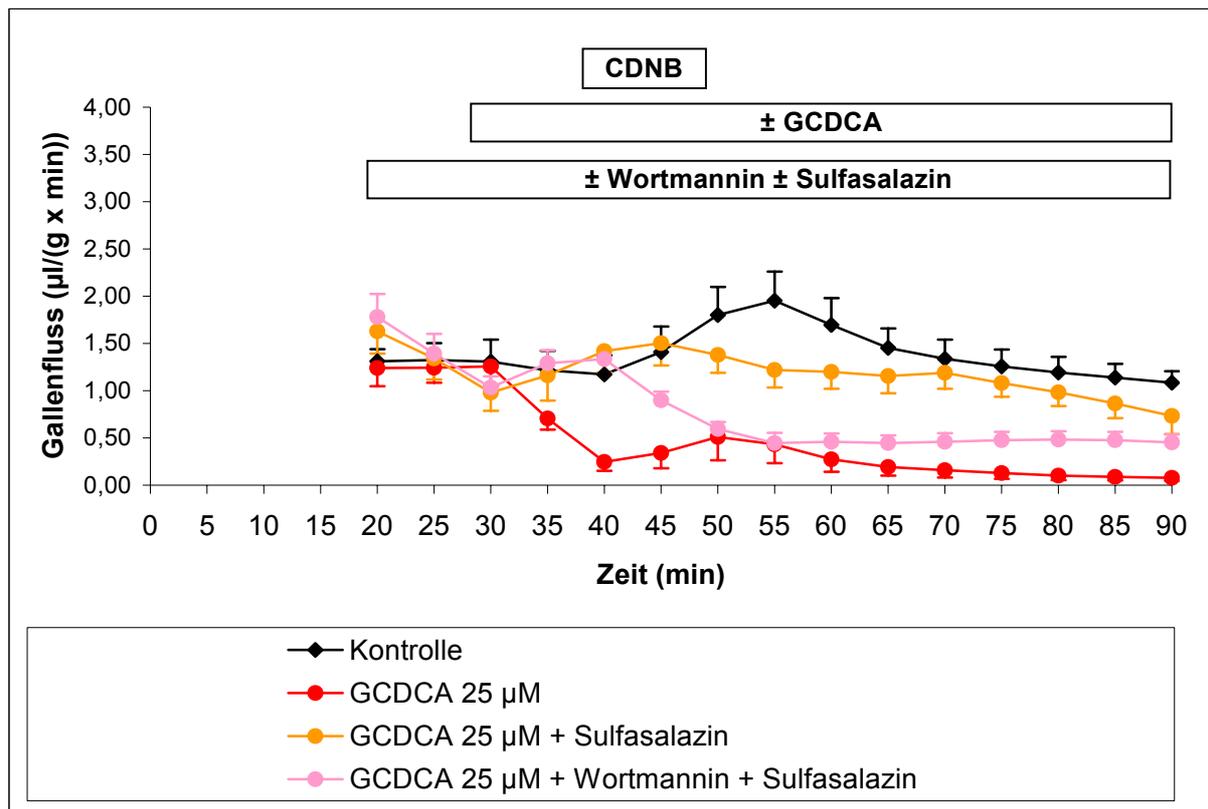


Abbildung 37: Gallenfluss bei Gabe von GCDCA 25 μM und Sulfasalazin 100 μM \pm Wortmannin 100 nM

(MW \pm SD, n = 6)

3.2.2.2 Aktivität der LDH und der GPT im hepatovenösen Effluat

3.2.2.2.1 Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA und Sulfasalazin

Aktivität der LDH im hepatovenösen Effluat

Die LDH-Aktivität bei den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) und bei isolierter Gabe von Wortmannin (**Gruppe B**) war über die gesamte Versuchsdauer hinweg niedrig (siehe **Kap. 3.1.1.3**, S. 55). Die Zugabe von Sulfasalazin (**Gruppe C**) lieferte vergleichbar niedrige Werte (siehe **Tabelle 18**). Somit kann man davon ausgehen, dass Sulfasalazin im vorliegenden Modell selbst zu keiner wesentlichen Zellschädigung der unstimulierten Leber führte.

Der immense Anstieg der Leberschädigung nach Infusion von 25 μM GCDCA wurde ebenfalls bereits beschrieben (siehe **Kap. 3.1.2.3**, S. 67).

Die zusätzliche Gabe von Sulfasalazin (**Gruppe I**) zeigte einen deutlichen protektiven Effekt. Fiel die LDH-Aktivität zur 45. min noch ähnlich wie bei alleiniger Gabe von 25 μM GCDCA (**Gruppe G**) aus, so konnte Sulfasalazin im weiteren Verlauf jedoch eine deutliche Reduktion des Leberzellschadens herbeiführen. So wurde die LDH-Aktivität zur 65. min bereits sehr stark gesenkt und erreichte zur 85. min sogar ein Niveau von ca. einem Fünftel des Wertes der alleinigen GCDCA-Gabe (siehe **Tabelle 18** und **Abbildung 38**).

Die Verabreichung von GCDCA in einer Konzentration von 12,5 μM (**Gruppe K**) führte zu einer deutlichen Leberzellschädigung, die gegen Perfusionsende schließlich ca. ein Drittel des gemessenen Zellschadens der Experimente mit Gabe von GCDCA in doppelter Konzentration (**Gruppe G**) betrug. Das Hinzufügen von Sulfasalazin (**Gruppe M**) zog analog den Versuchen mit doppelter GCDCA-Konzentration eine starke Verringerung der messbaren LDH-Aktivität auf etwa ein Fünftel, verglichen mit alleiniger Gallensäurengabe (**Gruppe K**), nach sich (siehe **Tabelle 18**).

Versuchsgruppe	LDH - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
A Kontrolle	1,3 \pm 0,7	0,8 \pm 0,4	0,9 \pm 0,7	1,1 \pm 1,0
C Sulfasalazin 100 μM	2,1 \pm 1,1	1,9 \pm 1,0 ^a	2,1 \pm 1,4	2,9 \pm 2,3
G GCDCA 25 μM	3,5 \pm 4,3	32,7 \pm 12,7 ^b	207,7 \pm 85,4 ^b	455,1 \pm 139,3 ^b
I GCDCA 25 μM + Sulfasalazin 100 μM	1,5 \pm 0,6	29,5 \pm 13,3	44,8 \pm 17,1 ^c	83,3 \pm 18,8 ^c
K GCDCA 12,5 μM	1,0 \pm 0,6	6,2 \pm 4,3 ^c	74,9 \pm 27,0 ^d	148,1 \pm 26,5 ^c
M GCDCA 12,5 μM + Sulfasalazin 100 μM	1,5 \pm 0,7	13,9 \pm 8,9	23,2 \pm 10,1 ^e	30,7 \pm 6,8 ^e

Tabelle 18: Effekt von GCDCA \pm Sulfasalazin auf die LDH-Aktivität im Effluat

(MW \pm SD, n = 6; ^a p < 0,05 vs. **Kontrolle**; ^b p < 0,01 vs. **Kontrolle**;
^c p < 0,01 vs. **GCDCA 25 μM** ; ^d p < 0,05 vs. **GCDCA 25 μM** ;
^e p < 0,01 vs. **GCDCA 12,5 μM**)

Aktivität der GPT im hepatovenösen Effluat

Unbehandelte Kontrollen (**Gruppe A**) und alleinige Gabe von Wortmannin (**Gruppe B**) waren durch geringe GPT-Aktivität über die gesamte Versuchsdauer gekennzeichnet (siehe S. 55). Die Infusion von Sulfasalazin (**Gruppe C**) bewirkte eine etwas stärkere Leberzellschädigung (siehe **Tabelle 19**), die durch Zugabe von Wortmannin (**Gruppe D**) nicht weiter signifikant verändert wurde.

GCDCA in einer Konzentration von 25 μM (**Gruppe G**) induzierte die höchste GPT-Aktivität von allen Versuchsgruppen (siehe **Kap. 3.1.2.3**, S.66). Die Zugabe von Sulfasalazin (**Gruppe I**) setzte die Höhe des Schädigungsparameters drastisch herab (siehe **Tabelle 19** und **Abbildung 38**).

GCDCA führte auch in halber Konzentration (12,5 μM , **Gruppe K**) zu einem starken Anstieg der GPT-Aktivität im Effluat. Durch Zugabe von Sulfasalazin (**Gruppe M**) wurden diese Werte bis auf Kontrollhöhe reduziert (siehe **Tabelle 19**).

Versuchsgruppe	GPT - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
A Kontrolle	2,2 \pm 1,9	1,1 \pm 0,9	0,9 \pm 1,4	2,1 \pm 1,0
C Sulfasalazin 100 μM	4,1 \pm 1,5	4,4 \pm 1,2 ^a	4,3 \pm 2,2 ^a	6,9 \pm 2,5 ^a
G GCDCA 25 μM	1,2 \pm 1,2	5,1 \pm 2,0 ^a	35,4 \pm 8,8 ^a	53,8 \pm 6,1 ^a
I GCDCA 25 μM + Sulfasalazin 100 μM	4,3 \pm 2,6 ^b	4,8 \pm 1,1	7,2 \pm 1,3 ^c	7,0 \pm 1,2 ^c
K GCDCA 12,5 μM	2,3 \pm 1,6	2,5 \pm 1,2 ^b	20,1 \pm 4,1 ^c	40,7 \pm 9,5 ^b
M GCDCA 12,5 μM + Sulfasalazin 100 μM	1,7 \pm 1,7	0,6 \pm 3,3	1,3 \pm 1,6 ^d	2,1 \pm 5,2 ^d

Tabelle 19: Effekt von GCDCA \pm Sulfasalazin auf die GPT-Aktivität im Effluat

(MW \pm SD, n = 6; ^a p < 0,01 vs. **Kontrolle**; ^b p < 0,05 vs. **GCDCA 25 μM** ;
^c p < 0,01 vs. **GCDCA 25 μM** ; ^d p < 0,01 vs. **GCDCA 12,5 μM**)

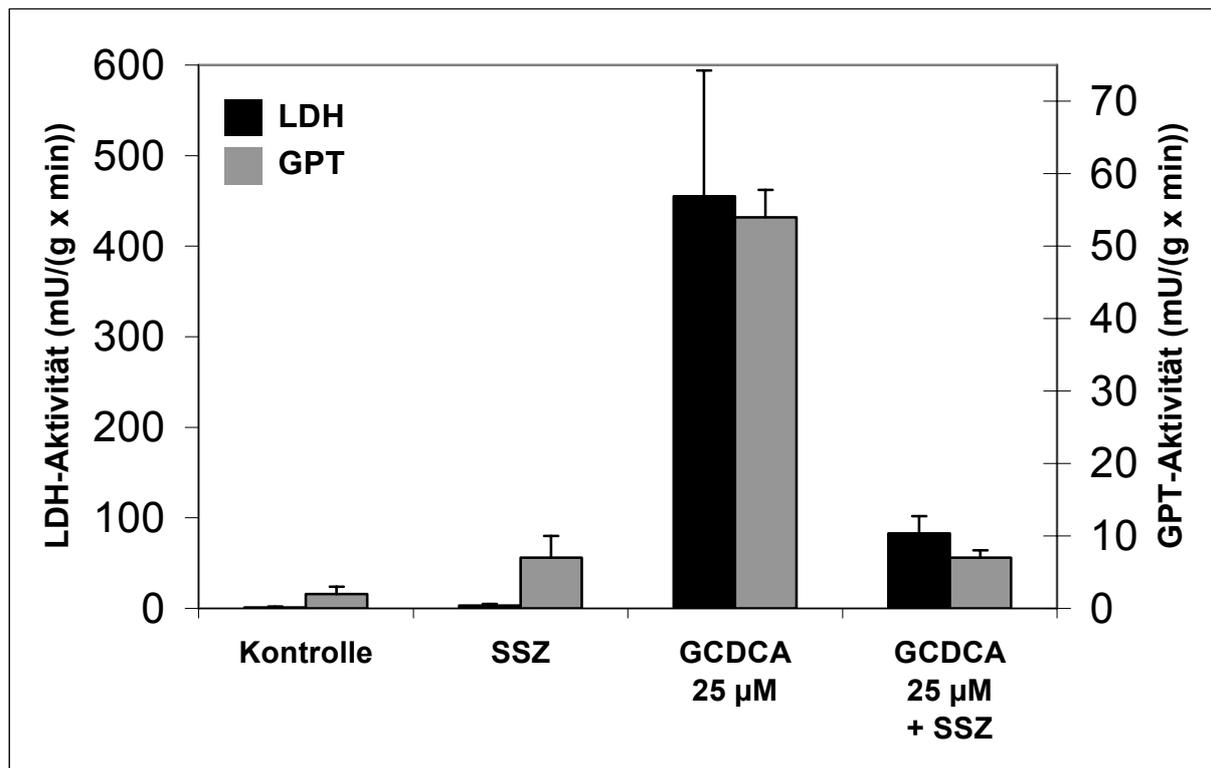


Abbildung 38: Effekt von GCDCA 25 µM ± Sulfasalazin 100 µM auf die Aktivität von LDH und GPT im Effluat zur 85. min

(MW ± SD, n = 6)

3.2.2.2.2 Effekt der gemeinsamen Gabe von GCDCA, Sulfasalazin und Wortmannin

Aktivität der LDH im hepatovenösen Effluat

Die gemeinsame Infusion von Sulfasalazin und Wortmannin (**Gruppe D**) führte tendenziell zu einer etwas stärkeren Zellschädigung als bei den anderen Kontrollversuchsreihen (**Gruppen A, B und C**; vgl. **Tabelle 6, Tabelle 18 und Tabelle 20**).

Bei kombinierter Infusion von 25 µM GCDCA, Sulfasalazin und Wortmannin (**Gruppe J**) zeigten zeitlicher Verlauf und Ausmaß der LDH-Aktivität folgende Charakteristik: Zunächst (45. min) stieg der Zellschaden stark an, danach (65. min, 85. min) blieb die Höhe der Enzymaktivität im Effluat signifikant unter den Vergleichswerten der alleinigen Infusion von 25 µM GCDCA (**Gruppe G**). Damit bewegte sich die Zellschädigung der gemeinsamen Zugabe von Sulfasalazin und Wortmannin in

einem Bereich zwischen derjenigen der alleinigen Zugabe der Einzelsubstanzen (**Gruppen H und I**) (vgl. **Tabelle 12**, **Tabelle 18** und **Tabelle 20**).

Versuchsgruppe	LDH - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
D Wortmannin 100 nM + Sulfasalazin 100 µM	2,6 ± 1,4	3,9 ± 2,3 ^a	3,3 ± 1,3 ^b	11,6 ± 19,4
J GCDCA 25 µM + Wortmannin 100 nM + Sulfasalazin 100 µM	1,8 ± 1,4	101,4 ± 37,86 ^c	127,9 ± 34,1 ^{c, d}	102,5 ± 24,1 ^d

Tabelle 20: Effekt von GCDCA + Sulfasalazin + Wortmannin auf die LDH-Aktivität im Effluat

(MW ± SD, n = 6; ^a p < 0,05 vs. **Kontrolle**; ^b p < 0,01 vs. **Kontrolle**;
^c p < 0,01 vs. **GCDCA 25 µM + Sulfasalazin**; ^d p < 0,01 vs. **GCDCA 25 µM**)

Aktivität der GPT im hepatovenösen Effluat

Die gemeinsame Infusion von Sulfasalazin und Wortmannin (**Gruppe D**) führte zu einer tendenziell leicht erhöhten GPT-Aktivität gegenüber unbehandelten Kontrollen (**Gruppen A, B und C**; vgl. **Tabelle 7**, **Tabelle 19** und **Tabelle 21**).

Der protektive Effekt von Sulfasalazin auf die GCDCA-induzierte Zellschädigung wurde durch die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe J**) geschmälert (vgl. **Tabelle 7** und **Tabelle 21**). Die GPT-Aktivität verhielt sich damit analog zu der Enzymaktivität der LDH.

Versuchsgruppe	GPT - Aktivität (mU/(g Leber x min))			
	25. min	45. min	65. min	85. min
D Wortmannin 100 nM + Sulfasalazin 100 µM	6,1 ± 2,0 ^a	5,5 ± 2,9 ^a	6,4 ± 4,7 ^b	6,2 ± 3,7 ^b
J GCDCA 25 µM + Wortmannin 100 nM + Sulfasalazin 100 µM	10,1 ± 4,1 ^{c, d}	15,8 ± 9,5 ^d	14,1 ± 7,5 ^c	16,2 ± 7,8 ^{c, d}

Tabelle 21: Effekt von GCDCA + Sulfasalazin + Wortmannin auf die LDH-Aktivität im Effluat

(MW ± SD, n = 6; ^a p < 0,01 vs. **Kontrolle**; ^b p < 0,05 vs. **Kontrolle**;
^c p < 0,01 vs. **GCDCA 25 µM**; ^d p < 0,05 vs. **GCDCA 25 µM + Sulfasalazin**)

3.2.2.3 Aktivierte Caspase 3 und Zytokeratin 18-Filament im Lebergewebe

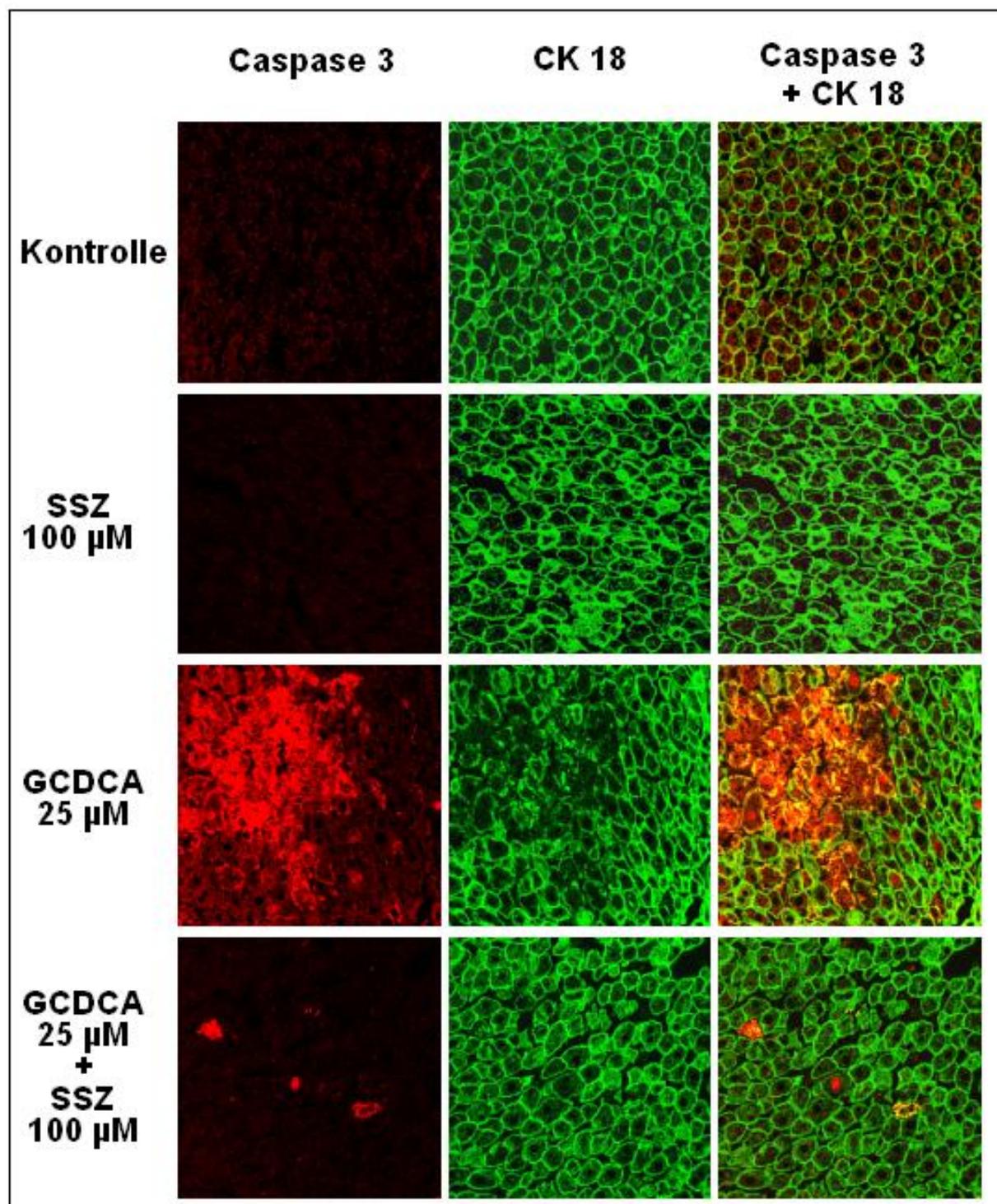
Wie bereits beschrieben, war die Rate apoptotischer Zellen in der kombinierten Caspase 3- und CK 18-Darstellung unter Kontrollbedingungen (**Gruppe A**) sehr gering (siehe **Kap. 3.1.1.4**, S.57). Nach alleiniger Gabe von 100 μM Sulfasalazin (**Gruppe C**) lag der Anteil apoptotischer Zellen vergleichbar niedrig (siehe **Abbildung 39**).

Perfusion mit 25 μM GCDCA (**Gruppe G**) führte zu ausgeprägter, großflächig verteilter Apoptose im Lebergewebe (Ergebnisse bereits genauer in **Kap. 3.1.2.4**, auf S. 70 beschrieben).

Die zusätzliche Gabe von 100 μM Sulfasalazin (**Gruppe I**) konnte den GCDCA-induzierten Zellschaden nahezu vollständig aufheben. Apoptotische Zellen waren lediglich noch vereinzelt zu erkennen (siehe **Abbildung 39**).

Alleinige Applikation von GCDCA führte auch in einer Konzentration von 12,5 μM (**Gruppe K**) zu einer sehr starken Induktion von Apoptose. Die Charakteristik des Verteilungsmusters glich dem Bild, das nach Gabe der doppelten Konzentration (25 μM , **Gruppe G**) beobachtet wurde, quantitativ fiel der Zellschaden tendenziell leicht niedriger aus.

Die zusätzliche Gabe von 100 μM Sulfasalazin (**Gruppe J**) hemmte auch hier die GCDCA-induzierte Zellschädigung fast gänzlich (siehe **Abbildung 39**).



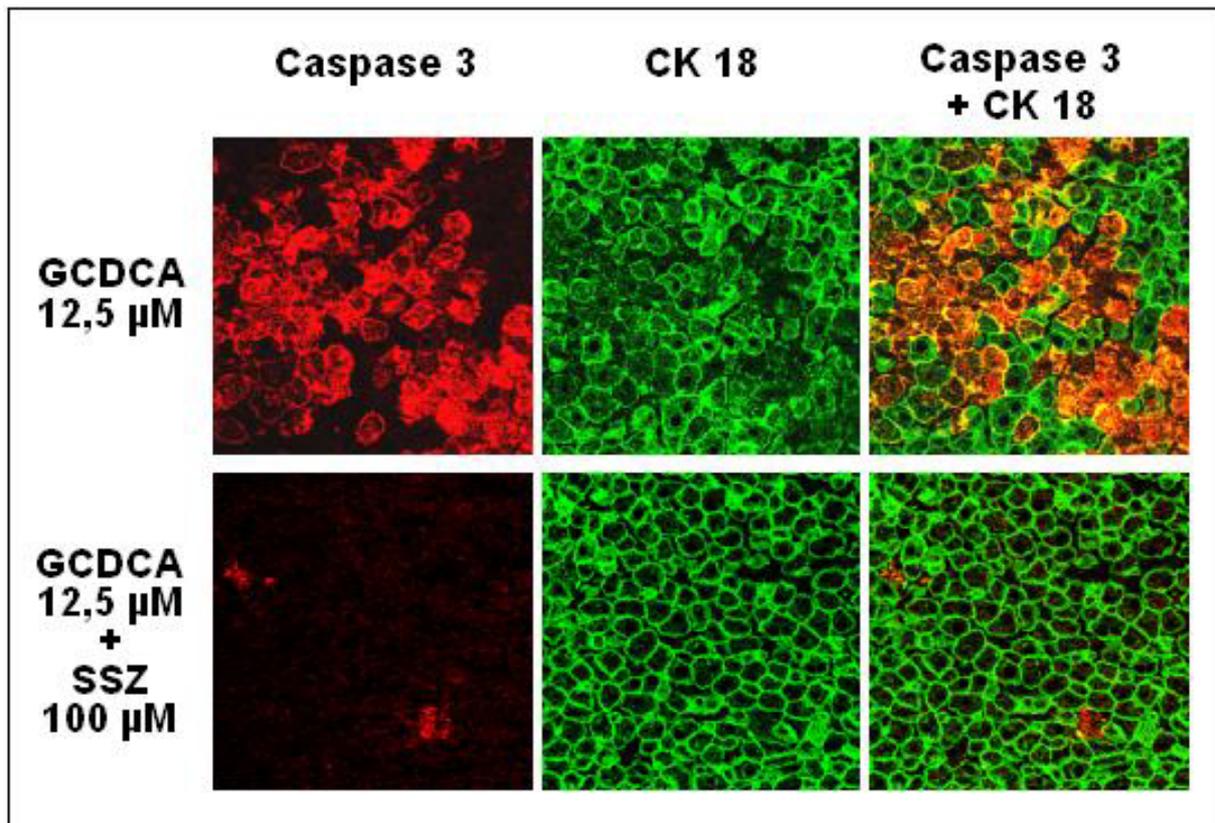


Abbildung 39: Effekt von GCDCA \pm Sulfasalazin auf die aktivierte Caspase 3 und das Zytokeratin 18-Filamentnetzwerk im Lebergewebe
(Darstellung repräsentativer Areale in 400-facher Vergrößerung)

3.2.2.4 Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat

Bei den aus dem Effluat der Vena cava inferior stammenden Proben einiger Versuchsgruppen wurde die Konzentration der Gallensäuren mittels Gaschromatographie bestimmt. Somit konnte Aufschluss über die Gallensäureaufnahmefähigkeit der Leber gewonnen werden.

Bei Gabe in einer Konzentration von 25 μM wurde GCDCA (**Gruppe G**) zur 45. min noch nahezu vollständig von der Leber aufgenommen. Lediglich 2 % erschienen im hepatovenösen Effluat. Gegen Ende der Perfusion war die Aufnahmekapazität der Leber jedoch schon stärker eingeschränkt, sodass zur 85. min schließlich nur noch 51 % extrahiert wurden. Dies ist möglicherweise durch die immense Leberschädigung zu erklären, die sich mit zunehmender Dauer der Perfusion in dieser Versuchsgruppe entwickelte (siehe **Kap. 3.1.2.3** und **Kap. 3.1.2.4**).

Die zusätzliche Gabe von Sulfasalazin (**Gruppe I**) führte zu einer Hemmung der Gallensäureaufnahme: Zur 45. wurde in den entsprechenden Experimenten 55 % der infundierten GCDCA aufgenommen, zur 85. min nur noch 34 %.

Nach Applikation von GCDCA in einer Konzentration von 12,5 μM (**Gruppe K**) wurde die Gallensäure zur 45. min restlos extrahiert, zur 85. min betrug die Aufnahme schließlich 86 %.

Zugabe von Sulfasalazin (**Gruppe M**) führte auch hier zu einer Reduktion der Aufnahmekapazität der Leber. Während zur 45. min noch 50 % der Gallensäure im Effluat erschien, so konnte gegen Ende der Experimente nur noch 24 % aus der angebotenen Perfusionslösung aufgenommen werden (siehe **Tabelle 22**).

Versuchsgruppe	Gallensäuren-Efflux [$\mu\text{mol/l}$]	
	45. min	85. min
G GCDCA 25 μM	0,5 \pm 0,1	12,2 \pm 3,6
I GCDCA 25 μM + Sulfasalazin 100 μM	11,3 \pm 1,2 ^a	16,5 \pm 1,5 ^b
K GCDCA 12,5 μM	0,0 \pm 0,0	1,7 \pm 0,8
M GCDCA 12,5 μM + Sulfasalazin 100 μM	6,3 \pm 1,7 ^c	9,5 \pm 1,0 ^c

Tabelle 22: Effekt von Sulfasalazin auf den hepatovenösen Efflux der Gallensäuren

(MW \pm SD, n = 6; ^a p < 0,001 vs. **GCDCA 25 μM** ; ^b p < 0,05 vs. **GCDCA 25 μM** ;
^c p < 0,001 vs. **GCDCA 12,5 μM**)

Die Differenz zwischen der hepatovenös detektierten und der in die Pfortader applizierten Gallensäurenkonzentration ($\Delta\text{C Pfortader} - \text{Lebervene}$ [μM]) wurde in der folgenden graphischen Darstellung als Maß für die Gallensäureaufnahme durch die Leberzellen zum jeweiligen Messzeitpunkt verwendet (siehe **Abbildung 40**).

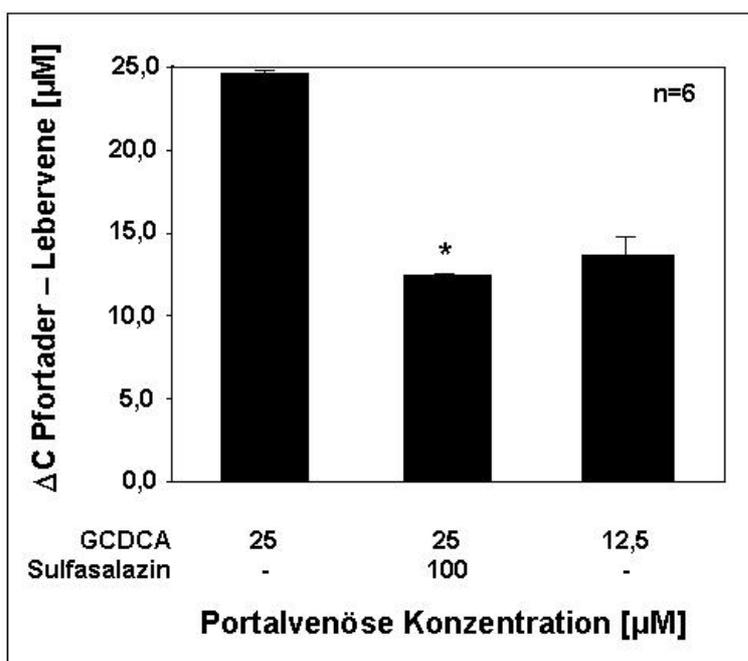


Abbildung 40:

Effekt von Sulfasalazin auf die Gallensäureaufnahme in die Leberzellen zur 45. min nach Perfusionsbeginn

(MW \pm SD, n = 6; * p < 0,001 vs. **GCDCA 25 μM**)

3.3 Übersichtsabbildungen

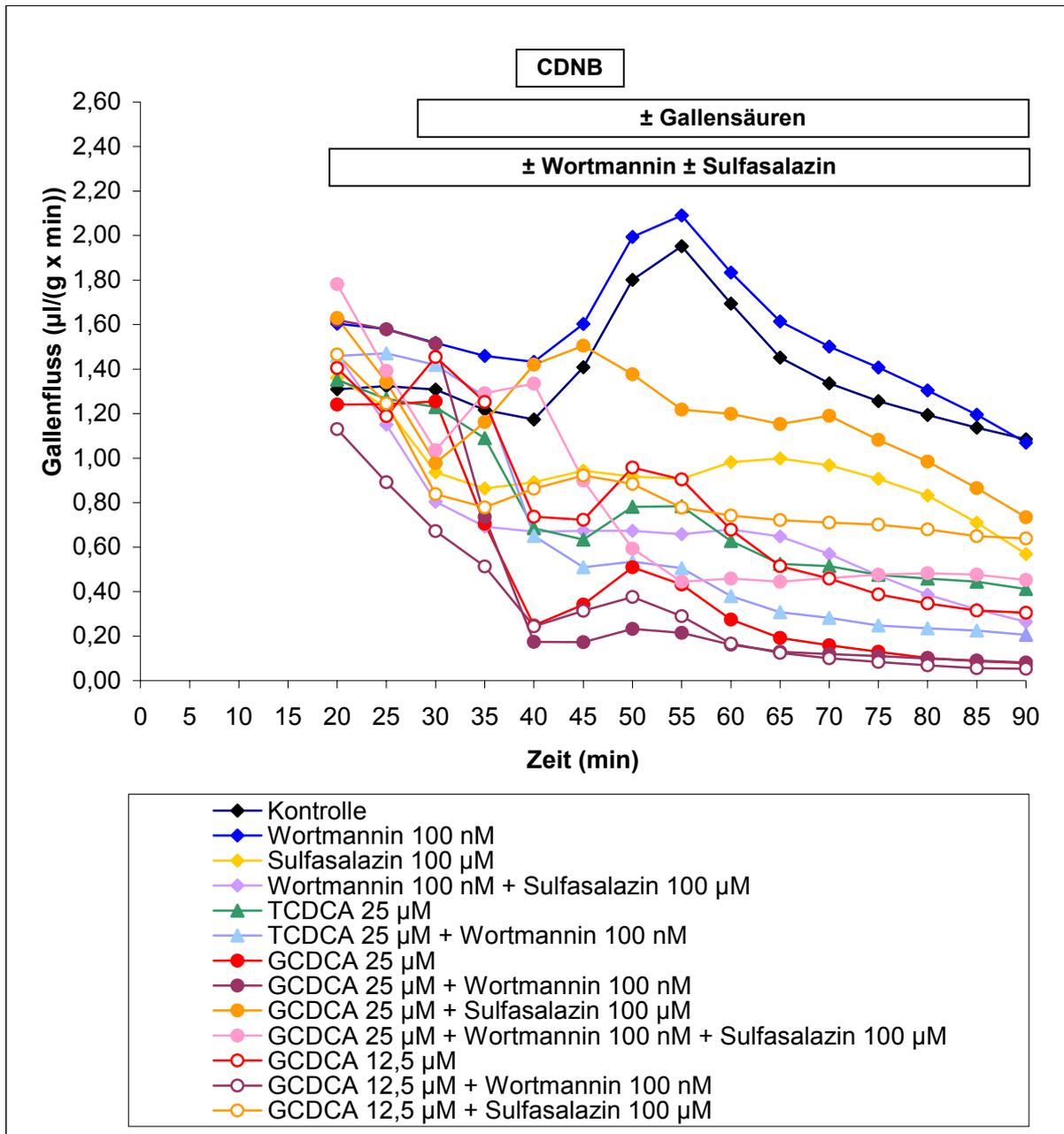


Abbildung 41: Übersicht über die Modulation des Gallenflusses

(MW, n = 6)

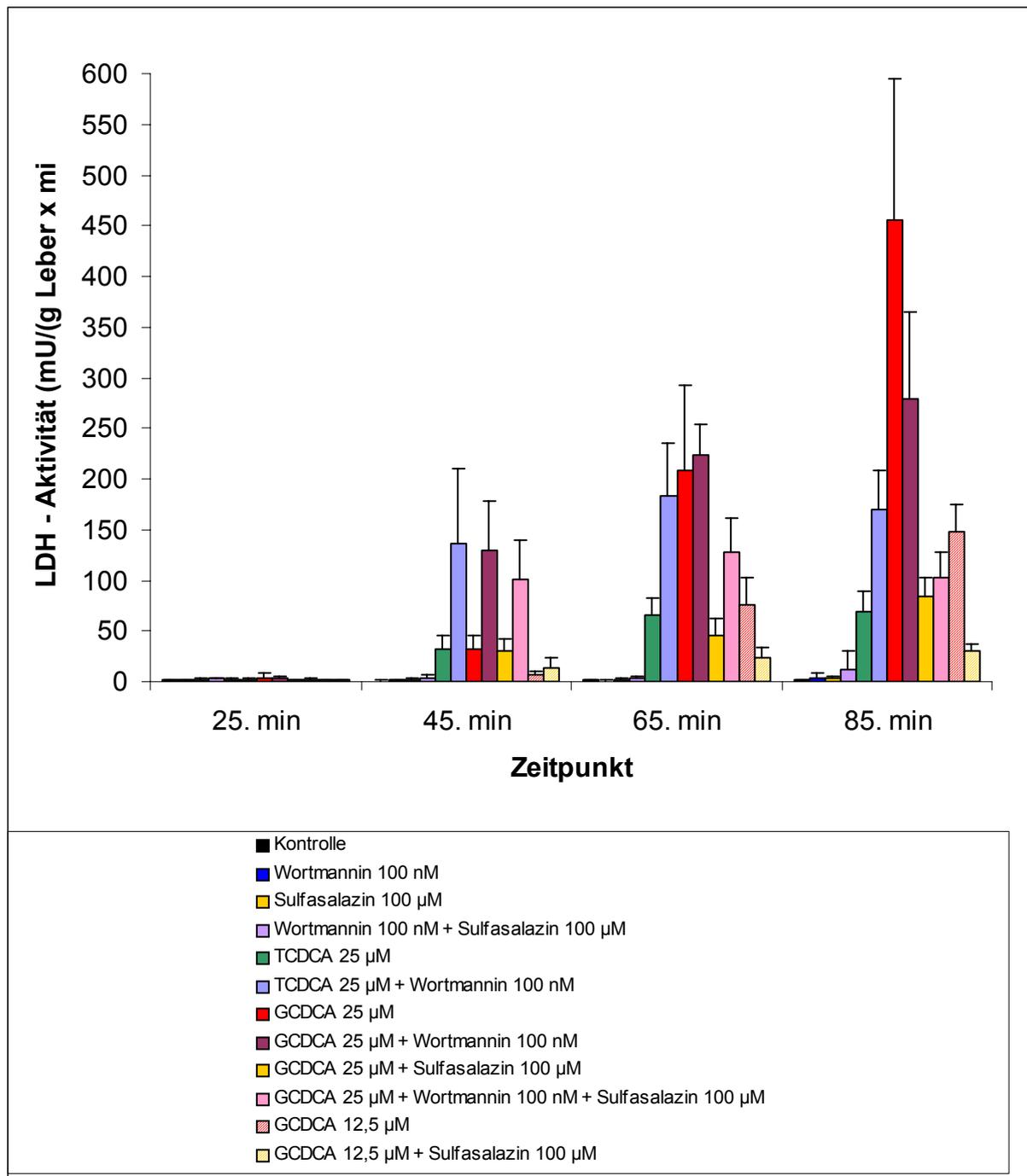


Abbildung 42: Übersicht über die Modulation der hepatovenösen LDH-Aktivität
 (MW ± SD, n = 6)

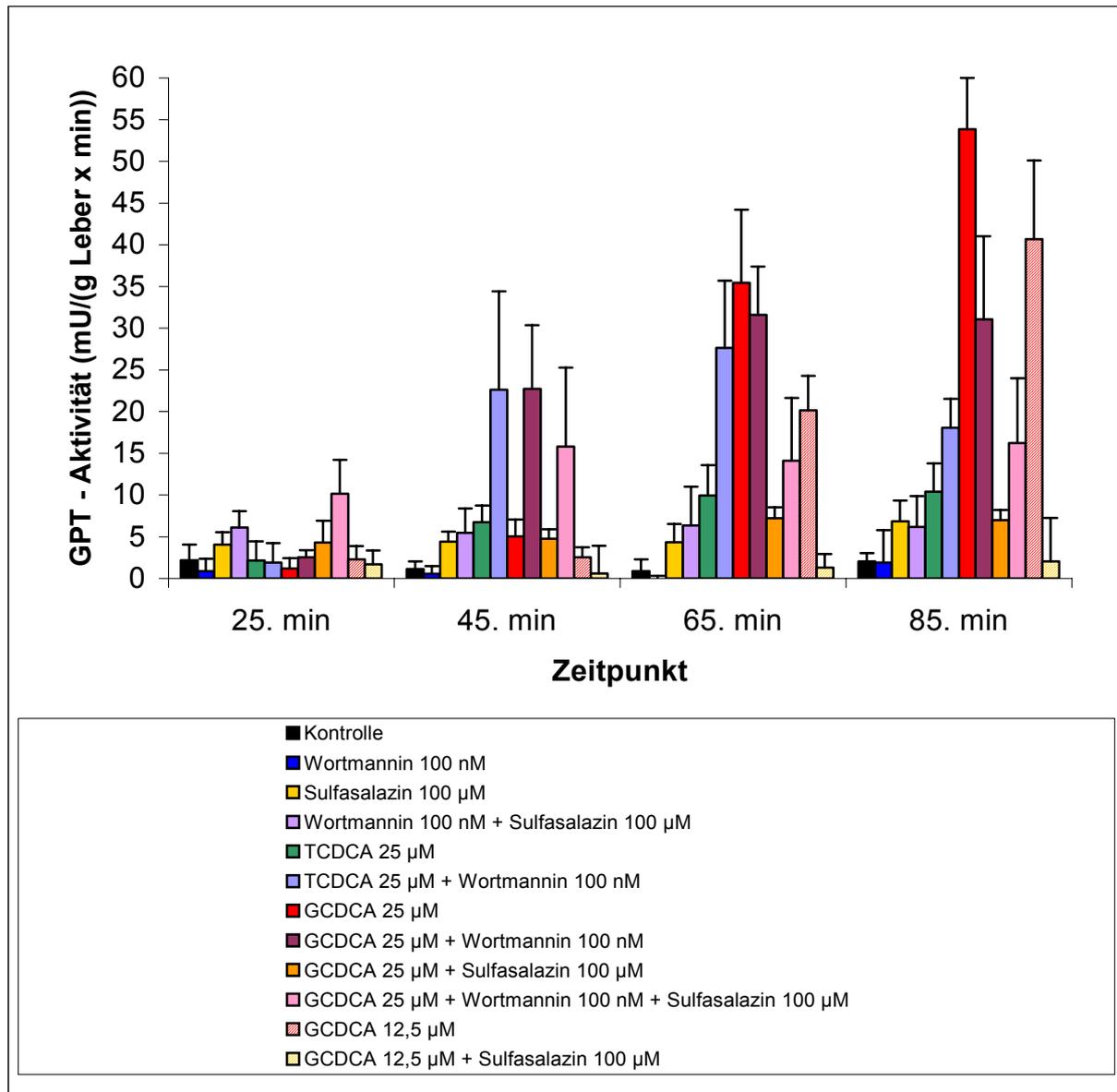


Abbildung 43: Übersicht über die Modulation der hepatovenösen GPT-Aktivität

(MW ± SD, n = 6)

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit untersucht Mechanismen der durch die quantitativ bedeutendste hydrophobe Gallensäure des Menschen, Chenodeoxycholsäure, induzierten Leberzellschädigung und deren Antagonisierung durch endogene und exogene Stimuli.

Hydrophobe Gallensäuren können in der Leber sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Zellschaden auslösen [170]. Langfristige Exposition gegenüber erhöhten Konzentrationen von hydrophoben Gallensäuren, wie sie bei cholestatischen Leberkrankheiten auftreten, kann eine irreversible Schädigung und den zirrhotischen Umbau der Leber nach sich ziehen. Hierbei wird der Apoptose als wesentlichem Mechanismus des Zelluntergangs eine bedeutende Rolle zugesprochen [150]. *In vivo* sind nicht alle Gallensäuren toxisch. Ausmaß und Progression einer cholestatischen Leberschädigung spiegeln vielmehr ein gestörtes Gleichgewicht zwischen den Effekten potentiell toxischer hydrophober und nicht-toxischer, eher hydrophiler Gallensäuren wider. Bei Patienten mit cholestatischen Leberkrankheiten werden die Glycin- und Taurin-Konjugate der Chenodeoxycholsäure zu den quantitativ dominierenden hydrophoben Gallensäuren, wobei die Glycin-Konjugate überwiegen [83]. Ihnen wird daher eine besondere Bedeutung für die Entstehung des Leberzellschadens unter Cholestase zugeschrieben [170].

Zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen haben bislang gezeigt, dass hydrophobe Gallensäuren Apoptose in Hepatozyten auslösen können [159, 162, 219]. Die Frage des Stellenwertes der Apoptose vor dem Hintergrund der komplexen Veränderungen während langfristiger Cholestase ist jedoch noch umstritten: Bislang wurden *in vivo*-Studien Gallensäuren-induzierter Apoptose vorzugsweise am Modell Gallengangs-ligierter (bile duct ligated; BDL) Nagetiere durchgeführt. Die Ergebnisse dabei waren allerdings unterschiedlich: Miyoshi et al. fanden bei ihren Untersuchungen, dass Gallengangs-Ligatur in Mäusen Fas-abhängige Apoptose verursacht [138]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte Apoptose hingegen nicht als einen bedeutenden Mechanismus der Leberschädigung nach BDL in Mäusen ausmachen [56]. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass Leberzellschädigung durch Apoptose ein Ereignis ist, dass zu einem frühen Zeitpunkt bei BDL-induzierter Cholestase auftritt,

allerdings bei längerem Bestehen der Cholestase durch Aktivierung antiapoptotischer Gene minimiert wird [127, 172].

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass Gallensäuren-induzierte Apoptose nicht nur *in vitro* in einer Lebertumor-Zelllinie, sondern auch in der intakten Rattenleber eine Rolle bei der Entstehung cholestatischen Leberschadens spielt.

4.1 Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung und Einfluss der PI₃-Kinasen

Die jüngere Literatur weist darauf hin, dass Gallensäuren intrazelluläre Signalprozesse aktivieren können und somit auch als Botenstoffe und Modulatoren transkriptioneller und posttranskriptioneller Prozesse in Leberzellen anzusehen sind. So wurde beispielsweise gezeigt, dass CDCA an den nukleären Farnesoid X-Rezeptor (FXR) bindet [128]. Als natürliche Liganden können Gallensäuren auf diese Weise Transkriptionsprozesse in Gang setzen, die ihre eigene enterohepatische Zirkulation regulieren, wahrscheinlich aber auch Bedeutung für diverse andere Stoffwechselfunktionen innerhalb der Zelle haben [148]. Außerdem greifen Gallensäuren in zytoplasmatische Proteinkinase-Kaskaden ein. So ist die nichttoxische Taurocholsäure (TCA) in der Lage, PI₃-Kinasen, einen potenten Aktivator von Überlebenssignalen [94, 217], zu aktivieren [134]. Die Aktivierung eines solchen Überlebenswegs könnte erklären, dass manche Gallensäuren trotz ihres hydrophoben Charakters keine Apoptose auslösen. Rust et al. konnten zeigen, dass die hydrophobe Gallensäure TCDCA einen PI₃-Kinasen-abhängigen Überlebenssignalweg aktiviert, der ihrer potentiellen Zytotoxizität entgegenwirkt [167].

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich die beiden Konjugate der CDCA *in vitro* unterschiedlicher Signalprozesse bedienen, die letzten Endes das Ausmaß der Toxizität der Gallensäure bestimmen [54, 159, 167]. Es blieb bislang jedoch unbekannt, ob Taurin- und Glycin-Konjugate auch im intakten Organ unterschiedliche Effekte auf die zelluläre Integrität der Leber haben. Darüber hinaus blieb die Frage offen, in welcher Weise eine Hemmung der PI₃-Kinasen

Gallensäuren-induzierten Leberzellschaden und Cholestase in der intakten Leber beeinflusst. Die vorliegende Arbeit wählte als experimentelles Modell die isoliert perfundierte Rattenleber, um diese Fragen in der intakten Leber und somit in Näherung der *in vivo*-Verhältnisse zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden hydrophoben Gallensäuren TCDCA und GCDCA auch in der intakten Leber unterschiedliche Toxizität aufweisen. TCDCA löst signifikant weniger Leberzellschädigung aus und wirkt in geringerem Ausmaß cholestatisch als GCDCA, wenn die Gallensäuren in niedrigen äquimolaren Konzentrationen verabreicht werden. Eine verschiedenartige Signalgebung über PI₃-Kinasen scheint diesem Umstand zugrunde zu liegen. Die relativ moderate Zellschädigung durch TCDCA geht mit einer gesteigerten Aktivierung von PI₃-Kinasen einher. Hemmung der PI₃-Kinasen durch Wortmannin verstärkt sowohl TCDCA-induzierten Leberzellschaden und Apoptose als auch den cholestatischen Effekt der Gallensäure, was sich durch einen Rückgang des Gallenflusses und der Sekretion des Mrp2-Modell-Substrats GS-DNP bemerkbar macht. GCDCA hingegen führt, alleine gegeben, zu massiver Leberzellschädigung. Während der sehr deutliche cholestatische Effekt von GCDCA in Analogie zu TCDCA durch Hemmung der PI₃-Kinasen verstärkt wird, reduziert Wortmannin im Gegensatz zu seiner Wirkung auf das Taurin-Konjugat den toxischen Effekt von GCDCA.

Leberzellschädigung und Apoptose:

Programmierter Zelltod und Freisetzung von LDH bzw. GPT verhielten sich innerhalb der Versuchsgruppen gleichsinnig. Dies scheint zunächst zu irritieren, da Apoptose theoretisch ohne extrazelluläre Auswirkungen ablaufen sollte (siehe **Kap. 1.1.2.3**). Ein systemisches Erscheinen von intrazellulären Enzymen ist in der Literatur für die gegebenen Versuchsbedingungen jedoch schon beschrieben und vermutlich auf ein Übersteigen der phagozytotischen Kapazität durch den plötzlichen Anfall einer großen Anzahl apoptotischer Zellen zurückzuführen [55]. Es ist wahrscheinlich, dass in der vorliegenden Arbeit ein Mischbild apoptotischen und primär oder sekundär nekrotischen Schadens zu beobachten ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass Taurochenodeoxycholsäure in der intakten Leber über eine moderate zytotoxische Wirkung verfügt, die durch Hemmung der PI₃-Kinasen deutlich verstärkt wird (siehe **Kap. 3.1.1.3** und **3.1.1.4**). Diese Ergebnisse fügen sich gut in das Bild ein, das bisherige *in vitro*-Untersuchungen zeichnen konnten: So zeigten Rust et al. in einer Ratten-Hepatomzelllinie, dass TCDCA neben apoptotischen Mechanismen gleichzeitig auch einen PI₃-Kinasen-abhängigen Überlebenssignalweg aktiviert [167]. Die dieser Gallensäure grundsätzlich innewohnende Toxizität scheint über entsprechende Mechanismen also wirkungsvoll minimiert zu werden. Eine weitere Arbeit beobachtete, dass das TCDCA-induzierte Überlebenssignal Fas-vermittelte Apoptose hemmen konnte, indem es die Aktivierung der Caspase 8 und die Translokation des proapoptotischen Bid an die Mitochondrien verhinderte [191]. Diese Effekte stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass TCDCA in primären Rattenhepatozyten alleine nicht in der Lage war, die Ausbildung des DISC hervorzurufen. Erst nach Zugabe der PI₃-Kinase-Inhibitoren Wortmannin oder LY294002 war der DISC durch TCDCA induzierbar [159].

Die isolierte Gabe des Glycin-Konjugats der Chenodeoxycholsäure in niedriger mikromolarer Konzentration führte im Gegensatz zum Taurin-Konjugat zu sehr starker Leberzellschädigung und ausgedehnter Apoptose (siehe **Kap. 3.1.2.3** und **3.1.2.4**). Zahlreiche Studien konnten *in vitro* bereits zeigen, dass GCDCA hepatozelluläre Apoptose induzieren kann [54, 80, 159, 162, 219]. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen die toxische Wirkung von GCDCA allerdings erstmals in der intakten Leber. Die proapoptotische Wirkung der isolierten Gabe einer anderen hydrophoben Gallensäure konnte *in vivo* bereits von Rodriguez et al. gezeigt werden: In Ratten, die eine mit 0,4 % Deoxycholsäure angereicherte Diät erhielten, beobachteten die Autoren eine signifikante Induktion hepatozellulärer Apoptose nach 10 Tagen [163]. Gemeinsam deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Gallensäuren-induzierte Apoptose eine wichtige Rolle in der Vermittlung des cholestatischen Leberzellschadens der Ratte spielt.

Welcher Mechanismen bedient sich die hydrophobe Gallensäure GCDCA, um hepatozelluläre Apoptose auszulösen? Mehrere *in vitro*-Untersuchungen haben diesbezüglich Modelle angeboten: Faubion et al. konnten beispielsweise zeigen,

dass GCDCA Apoptose in Nagetier-Hepatozyten induziert, wobei ein Fas-abhängiger Mechanismus unabhängig von dessen Liganden aktiviert wird [54]. Die notwendige Oligomerisierung von Fas scheint durch den GCDCA-induzierten Transport Fas-haltiger intrazellulärer Vesikel an die Zellmembran zu erfolgen [181]. Für das Auslösen des apoptotischen Programms scheint in diesem Signalweg eine Phosphorylierung von Fas an dessen Tyrosin-Rest entscheidend zu sein, für die wiederum eine Beteiligung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) eine wesentliche Rolle spielt [159]. Außerdem setzt GCDCA die apoptotische Schwelle in Leberzellen durch Hochregulation der Expression des Todesrezeptors 5/TRAIL 2-Rezeptors herab [80].

Apoptose ist das führende Merkmal der GCDCA-induzierten Leberzellschädigung. Die in der vorliegenden Arbeit applizierte Dosis von 25 μ M GCDCA liegt weit unterhalb der kritischen mizellären Konzentration (CMC für GCDCA: 4 mM [84]), was eine rein mechanische Schädigung der Leberzellen unwahrscheinlich macht. Apoptotische Areale waren diffus verteilt, eine zonale Präferenz (Zone 1, periportal; Zone 2, intermediär; Zone 3, perizentral) war nicht erkennbar (siehe **Kap. 3.1.2.4**). Somit scheint es fraglich, dass es sich um konzentrationsabhängige Effekte der Gallensäurenbelastung handelt. Das Auftreten untergehender Zellen in Clustern könnte beispielsweise auf Kommunikation zwischen benachbarten Hepatozyten zurückzuführen sein. So benötigen epitheliale Zellen Kontakt mit der extrazellulären Matrix, um Apoptose, die durch Verlust der Zellverankerung induziert wird (Anoikis), hemmen zu können [157]. Integrine erfassen dabei mechanische Veränderungen im Umfeld der Zelle und wandeln sie intrazellulär in chemische Signale um. Fällt eine ausreichende Adhäsion an Nachbarstrukturen weg, so kann beispielsweise ein Jun-Kinase-abhängiger Signalweg zur Apoptose einer Zelle führen, in der primär kein oder nur ein unterschwelliger apoptotischer Stimulus vorhanden war [222]. Es ist also durchaus vorstellbar, dass der Untergang einer großen Anzahl an Leberzellen nach GCDCA-Gabe zu einer weiteren Triggerung des programmierten Zelltods in der unmittelbaren Umgebung führte.

Eine Inhibition der PI₃-Kinasen hatte bei Gabe des Glycin- und des Taurin-Konjugats der CDCA gegensätzliche Folgen: Überraschenderweise führte der Einsatz von Wortmannin zu einer Verringerung der GCDCA-vermittelten Leberzellschädigung

(siehe **Kap. 3.1.2.3** und **Kap. 3.1.2.4**). Damit stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu einer Studie von Schoemaker et al., die eine Verstärkung der GCDCA-induzierten Caspase 3-Aktivierung nach Einsatz des PI₃-Kinasen-Inhibitors LY294002 beobachteten [171]. Allerdings wurden diese Untersuchungen an primären Rattenhepatozyten durchgeführt. Möglicherweise unterscheidet sich die GCDCA-abhängige Signalgebung also *in vitro* und im intakten Organ. Ein PI₃-Kinasen-abhängiger Überlebenssignalweg, wie man ihn für TCDCA postulieren kann, scheint hier für GCDCA nicht zu existieren oder zumindest nicht suffizient aktivierbar zu sein. Man könnte im Gegenteil sogar spekulieren, dass GCDCA einen Teil seiner Toxizität über PI₃-Kinasen vermittelt, also einen PI₃-Kinasen-abhängigen Todessignalweg in Gang setzt. Tatsächlich konnten Aki et al. einen stimulierenden Effekt der PI₃-Kinasen auf Zelltod beobachten [2, 3]. Allerdings führten sie ihre Untersuchungen an H9c2-Zellen durch, einer Zelllinie, die sich von Ratten-Kardiomyozyten herleitet, und der von ihnen beobachtete Effekt bezog sich ausschließlich auf nekrotischen Zelltod. In der vorliegenden Arbeit scheint allerdings Apoptose ein vorherrschender Mechanismus zu sein, und gerade hierfür ist die schützende Rolle der PI₃-Kinasen in der bisherigen Literatur ausgezeichnet belegt [60, 94, 159, 167, 191, 217]. Ein über diese Lipidkinasen vermittelter Todessignalweg scheint somit eher unwahrscheinlich.

Gallensäuren-induzierte Apoptose setzt die Aufnahme der Gallensäure in die Zelle voraus [171]. Dieser Vorgang scheint in Hepatozyten teilweise über PI₃-Kinasen reguliert zu werden [211, 212]. So konnten Webster et al. zeigen, dass die Stimulation der Gallensäureaufnahme und die Insertion des Gallensäuretransporters Ntcp in die sinusoidale Membran der Leberzelle PI₃-Kinasen-vermittelt ist [211]. Dabei identifizierten sie PKB/Akt als einen potenziellen Signalmediator. Untersuchungen aus jüngerer Zeit bestätigen diese Beobachtung, legen allerdings nahe, dass die Translokation des Gallensäuretransporters Ntcp möglicherweise auch PKC- ζ -abhängig, jedoch PKB-unabhängig ablaufen kann [131]. Man könnte daher spekulieren, dass eine Hemmung der PI₃-Kinasen den GCDCA-vermittelten Leberzellschaden reduziert, indem die Aufnahme der toxischen Gallensäure durch verminderte Translokation von Ntcp gedrosselt wird. Diese Hypothese wird durch die vorliegende Arbeit gestützt. CDCA-Spiegel im Effluat waren bei Lebern, welche mit GCDCA und Wortmannin behandelt wurden, tendenziell höher als bei alleiniger

GCDCA-Gabe (siehe **Kap. 3.1.2.6**), was auf eine reduzierte Gallensäureaufnahme der Leberzellen bei Hemmung der PI₃-Kinasen hindeutet.

Mechanismen der Leberzellschädigung nach Gabe der Gallensäure TLCA ähneln möglicherweise denen nach Administration von GCDCA. Auch hier kam es durch Hemmung der PI₃-Kinasen zu einer Verminderung der Toxizität. Gleichzeitig wurde jedoch auch der cholestatische Effekt der TLCA durch Wortmannin reduziert [23], wohingegen er bei GCDCA eher verstärkt zu werden scheint. Es ist jedoch fraglich, ob der anticholestatische Effekt einer Hemmung der PI₃-Kinasen die zytoprotektive Wirkung von Wortmannin bei TLCA-induzierter Cholestase in ihrer Gesamtheit zu erklären vermag. Beuers et al. beobachteten nämlich, dass TUDCA die Gallensekretion in mit TLCA-behandelten Lebern ebenfalls verbesserte, wohingegen der TLCA-induzierte Zellschaden nicht aufgehoben werden konnte [23]. Bisher unveröffentlichte Daten von Denk et al. zeigen im gleichen Modell, dass weder eine Inhibition der PI₃-Kinasen noch die Gabe von TUDCA zu einer wesentlichen Beeinflussung der Aufnahme von TLCA in den Hepatozyten führten. Eine Beladung der Zellen mit der toxischen Gallensäure fand also in vergleichbarem Umfang statt. Wahrscheinlich sind somit noch andere Mechanismen involviert, durch die Wortmannin unabhängig von der Gallensäureaufnahme einen protektiven Einfluss gegenüber hydrophoben Gallensäuren ausüben kann. Die beobachtete Analogie zwischen TLCA und GCDCA im Kontrast zu den Ergebnissen bei TCDCA ist als weiterer Beleg für die unterschiedliche Rolle der PI₃-Kinasen in der Signalgebung verschiedener hydrophober Gallensäuren zu werten.

Phosphorylierung der PKB:

PI₃-Kinasen rufen eine Reihe zellulärer Antworten hervor, unter anderem die Regulation der Expression von Genen und die Aktivierung von Signalkaskaden, welche eine Rolle in Prozessen wie Membranfaltung, Endozytose, Glukose-Transport, DNA-Synthese und in der zellulären Überlebenssignal-Antwort auf zahlreiche apoptotische Stimuli spielen [32, 42, 134]. So gelten PI₃-Kinasen als Aktivatoren verschiedener antiapoptotischer Signalmediatoren, unter denen sich auch PKB/Akt und atypische Isoformen der Proteinkinase C (PKC- ζ und PKC- λ/ι)

befinden [46, 60]. PKB/Akt wird über das PI₃-Kinase-Produkt Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat aktiviert [177]. Sie hemmt den programmierten Zelltod in verschiedenen Zelltypen und gegenüber zahlreichen apoptotischen Stimuli [42].

In einer Rattenhepatomzelllinie konnte gezeigt werden, dass eine PI₃-Kinasen-abhängige PKC- ζ - und NF- κ B-Aktivierung für die Reduktion der TCDCA-induzierten Zellschädigung verantwortlich war, wobei keine PKB/Akt-Aktivierung verzeichnet werden konnte [167]. Im Gegensatz zu diesen *in vitro*-Untersuchungen konnte die vorliegende Arbeit jedoch eine signifikante PI₃-Kinasen-vermittelte Aktivierung von PKB/Akt in mit TCDCA behandelten Lebern zeigen (siehe **Kap. 3.1.1.5**). Dies legt nahe, dass TCDCA in der intakten Leber zu einer Aktivierung des PI₃-Kinase/Akt-Signalwegs führt, der ihre Toxizität zu vermindern vermag. Aktivierung von PKB/Akt kann die Zelle über mehrere Mechanismen vor Apoptose schützen, u.a. durch die Phosphorylierung des proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieds Bad, das daraufhin nicht mehr an das antiapoptotische Protein Bcl-x_L binden kann, um dieses zu inhibieren [43, 221]. Außerdem resultiert eine Aktivierung von PKB/Akt in einer Phosphorylierung und Hemmung der Caspase 9 [34] und unterbindet die Translokation des proapoptotischen Proteins Bax an die mitochondriale Membran [198]. Darüber hinaus scheint PKB/Akt in der Lage zu sein, NF- κ B über Aktivierung der I κ B-Kinase positiv zu regulieren [165], sowie eine Induktion der Ubiquitinierung des Apoptoseregulators p53 durch Phosphorylierung von MDM2 hervorzurufen [223].

Im Gegensatz zu TCDCA beeinflusste GCDCA die PKB/Akt-Phosphorylierung nicht stark (siehe **Kap. 3.1.2.6**). Dennoch veränderte eine Hemmung der PI₃-Kinasen auch das Wirkungsprofil von GCDCA und führte zu verringerter Zellschädigung, während der cholestatische Effekt der Gallensäure jedoch verstärkt wurde. Wie können diese Resultate erklärt werden? Bislang sind drei Klassen und eine Vielzahl von Subklassen der PI₃-Kinasen identifiziert worden, die alle von Wortmannin gehemmt werden können [200]. Klasse I unterteilt sich weiter in I_A und I_B. *In vitro* sind sie in der Lage, Phosphatidylinositol (PtdIns), Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PtdIns(4)P) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) umzusetzen. *In vivo* scheint jedoch Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) ihr Hauptprodukt zu sein. Die PI₃-Kinasen der Klasse II beinhalten die Subklassen PI₃K-C2 α , PI₃K-C2 β und PI₃K-C2 γ . *In vitro* phosphorylieren alle Isoenzyme der Klasse II PtdIns und

PtdIns(4)P, ihr *in vivo*-Spektrum ist jedoch bisher noch nicht aufgeklärt. Obwohl PI₃K-C2 α und PI₃K-C2 β eine breite Verteilung in verschiedenen Geweben aufweisen, findet sich die Expression der PI₃K-C2 γ interessanterweise vorzugsweise in Hepatozyten [143]. Die Klasse III der PI₃-Kinasen umfasst bislang nur ein einzelnes Enzym, das ein menschliches Homolog zu dem Hefeprotein Vps34 ist und am zielgerichteten Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zu Vakuolen beteiligt ist. Das Klasse III-Enzym katalysiert die Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P) [200]. Welche individuellen Funktionen die verschiedenen Untergruppen und Isoformen der PI₃-Kinasen ausüben, ist noch kaum bekannt [8]. So könnte GCDCA in der intakten Leber nun beispielsweise Subklassen der PI₃-Kinasen aktivieren, ohne dabei eine deutliche Aktivierung von PKB/Akt herbeizuführen. Interessanterweise zeigte auch die Gallensäure TCDCA in Hepatomzellen eine offensichtliche Aktivierung PI₃-Kinasen-abhängiger Signale bei fehlender Aktivierung von PKB/Akt [167]. Denkbar wäre auch, dass es nach Stimulation mit GCDCA zu einer Aktivierung der PI₃-Kinasen oder einzelner Subklassen in isolierten Kompartimenten der Leberzelle kommt, während andere subzelluläre Räume davon unberührt bleiben. Findet die PI₃-Kinase-Aktivierung nun ausschließlich in einem solchen Kompartiment statt, so wäre es vorstellbar, dass Wortmannin eine wirkungsvolle Hemmung herbeiführen kann, während gleichzeitig aber die Nachweisbarkeit einer quantitativen Steigerung der phosphorylierten Form der PKB im gesamten Leberhomogenat herabgesetzt ist. Die Hypothese einer kompartimentären Verteilung von Isoformen der PI₃-Kinase kann am Beispiel der PI₃-Kinase-Klasse II α gestützt werden. Domin et al. zeigten in verschiedenen Zelltypen, dass sie im Golgi-Apparat der Zelle und in Clathrin-ummantelten Vesikeln konzentriert ist, während die Isoenzyme der Klasse I α in großem Ausmaß im Zytosol vorkommen und nach Aktivierung an die Plasmamembran transloziert werden [47, 93]. Eine zukünftige Entwicklung spezifischer Inhibitoren der PI₃-Kinase-Subklassen könnte eine Differenzierung ihrer Effekte ermöglichen.

Gallenfluss und biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP:

Der PI₃-Kinasen-Inhibitor Wortmannin hatte ohne zusätzliche Infusion von Gallensäuren keinen Einfluss auf den Gallenfluss oder die sekretorische Kapazität

der apikalen Transportpumpe Mrp2 (siehe **Kap. 3.1.1.1.1** und **3.1.1.2.1**). Diese Ergebnisse decken sich gut mit früheren Beobachtungen [23]. Man könnte also annehmen, dass eine eventuelle Basisaktivität der PI_3 -Kinasen in der unstimulierten Leber keinen wesentlichen Einfluss auf Gallensekretion und Mrp2-Transportkapazität hat. Nicht berücksichtigt wurde die Rolle des vesikulären Beitrags zum Gallenfluss, der in der isoliert perfundierten Rattenleber einen geringen Anteil am Gesamtgallenfluss (< 10 %) unterhält [38]. So scheint der Gesamtvorgang der vesikulären Transzytose vom Blut in die Galle durch die Basisaktivität der PI_3 -Kinasen gefördert zu werden [58], während der Teilschritt der reinen Exozytose an der kanalikulären Membran gehemmt zu werden scheint [23]. In der unstimulierten Zelle könnte das von untergeordneter Bedeutung sein. Als posttranskriptionelle Mechanismen können vesikulär gesteuerte Prozesse allerdings relativ schnell ablaufen und für eine kurzfristige Adaptation an veränderte Bedingungen innerhalb der Zelle sorgen. Für die Beurteilung der weiteren Experimente unter Stimulationsbedingungen sei daher vorausgeschickt, dass die nach einem entsprechenden Reiz auftretende Vesikel-vermittelte Regulation der Dichte von Transportmolekülen an den Membranen eine entscheidende Rolle für den Gesamtgallenfluss spielen kann.

Intravenöse Gabe von TCDCA in niedrigen mikromolaren Konzentrationen verursachte Cholestase in Ratten, bei denen eine Gallenfistel angelegt wurde [63, 100]. In der vorliegenden Arbeit führt die Gabe von 25 μ M TCDCA zu einer deutlichen Abnahme von Gallenfluss und Sekretion organischer Anionen (siehe **Kap. 3.1.1.1.2** und **3.1.1.2.2**). Die Tatsache, dass die Schädigungsparameter dabei allerdings relativ moderat ausfielen, deutet darauf hin, dass der cholestatische Effekt von TCDCA zum großen Teil unabhängig von einem zytotoxischen Effekt zustande zu kommen scheint. Die tendentielle Verschlechterung der TCDCA-induzierten Cholestase durch Hemmung der PI_3 -Kinasen könnte über zwei unabhängige Mechanismen zu erklären sein: 1. Inhibition der PI_3 -Kinasen steigert die Toxizität von TCDCA. Die Sekretionsleistung der Leber ist somit durch ein Schwinden der Anzahl funktionsfähiger Hepatozyten aus dem Gesamtverband gegenüber Normalbedingungen eingeschränkt; 2. Hemmung des PI_3 -Kinase-Systems führt zu Veränderungen der hepatobiliären Transportprozesse. Diese Überlegung wird unterstützt von Beobachtungen, die Misra et al. anstellten: Sie konnten zeigen, dass

PI₃-Kinasen in der perfundierten Rattenleber über vesikuläre Transportmechanismen die Insertion ATP-abhängiger Transporter in die kanalikuläre Membran vermitteln und damit die Sekretionsleistung des Hepatozyten steuern [134]. Eine weitere Studie legt überdies nahe, dass auch die Funktion von apikalen Gallensäuretransportern sowie die der Konjugatexportpumpe Mrp2 von einer Aktivität der PI₃-Kinasen abhängig sind [135].

Verschiedene hydrophobe Gallensäuren scheinen eine unterschiedliche cholestatische Potenz zu besitzen. Die vorliegende Arbeit beobachtet erstmals, dass es unter dem Einfluss von GCDCA zu einer raschen und sehr starken Abnahme des Gallenflusses kommt, der wesentlich deutlicher ausfällt als nach Infusion des Taurin-Konjugats (siehe **Kap. 3.1.2.1.2** und **Abbildung 41**). Ein ähnlich stark sekretionshemmender Effekt wurde bereits für TLCA gezeigt [26]. PI₃-Kinasen-Hemmung verstärkte den cholestatischen Effekt von GCDCA. Analog zu TCDCA könnte diesem Effekt eine Reduktion kanalikulärer Transportproteine nach dem Konzept von Misra et al. [134, 135] zugrunde liegen (siehe oben).

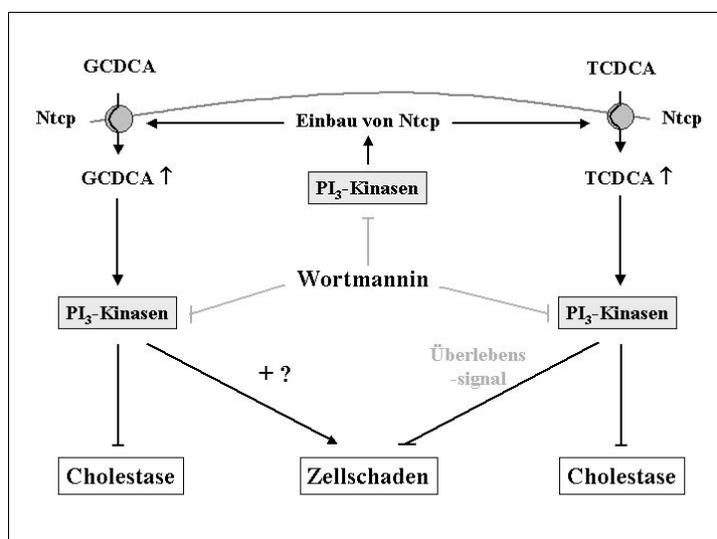


Abbildung 44:

Konzept der unterschiedlichen Rolle der PI₃-Kinasen in der Vermittlung von Gallensäure-induziertem Zellschaden

Bedeutung dieser Ergebnisse

Der Akkumulation potentiell toxischer Gallensäuren wird eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Zellschädigung bei cholestatischen Leberkrankheiten zugeschrieben [88, 170].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich manche Gallensäuren PI_3 -Kinasen-abhängiger Signalmechanismen bedienen, um die ihnen innewohnende Toxizität und ihre cholestatische Wirkung abzuschwächen, während die Lipidkinasen bei anderen Gallensäuren wiederum eine völlig andere Rolle in der Signalgebung einzunehmen scheinen. Ein Eingriff in diese endogene Signalmechanismen kann das Wirkprofil der Gallensäure entscheidend verändern. Das Glycin- und das Taurin-Konjugat der Chenodeoxycholsäure sind die führenden Dihydroxygallensäuren bei Patienten mit cholestatischen Leberkrankheiten und scheinen für Cholestase-assoziierte Leberschädigung verantwortlich zu sein [170]. Die neuartigen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit zu der Schlüsselrolle der PI_3 -Kinasen bei der CDCA-induzierten Leberzellschädigung in der intakten Leber könnten daher zum Verständnis der komplexen Signalgebung im Rahmen cholestatischer Leberschädigung und zur Entwicklung zukünftiger therapeutischer Strategien für die Behandlung chronischer cholestatischer Leberkrankheiten beitragen.

4.2 Einfluss von Sulfasalazin auf die Gallensäuren-induzierte Leberzellschädigung

Sulfasalazin wird in der Literatur als potenter Modulator intrazellulärer Signalmechanismen in verschiedenen Zellreihen beschrieben [121, 210]. Die Beeinflussung von Apoptose ist dabei ein zentraler Gesichtspunkt (siehe auch **Kap. 1.1.4**). Der Effekt von Sulfasalazin auf eine entsprechende Signalgebung in Hepatozyten ist bislang jedoch noch völlig unbekannt.

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals die Modulation hepatozellulärer Apoptose durch Sulfasalazin. Zwei verschiedene experimentelle Modelle zeigen übereinstimmende Effekte von Sulfasalazin: Sowohl in einer humanen Leberzelllinie *in vitro*

als auch in der intakten Leber hemmt Sulfasalazin GCDCA-induzierte Apoptose. Die cholestatische Wirkung der Gallensäure wird ebenfalls reduziert. Mögliche Mechanismen für den protektiven Effekt Sulfasalazins könnten eine Hemmung der Gallensäureaufnahme und eine davon unabhängige Inhibition der apoptotischen Signalkaskaden, u.a. über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sein.

Beeinflussung der Gallensäuren-induzierten Leberzellschädigung/Apoptose:

Derzeit finden sich in der Literatur keine Daten hinsichtlich des Effekts von Sulfasalazin auf Apoptose in Hepatozyten. Die Tatsache, dass Sulfasalazin in Hepatomzellen antiapoptotisch wirkt (siehe **Kap. 3.2.1.1.2**), kam zunächst dennoch überraschend, da die bisherige Literatur vorwiegend eine proapoptotische Rolle Sulfasalazins in anderen Zelltypen beschreibt. Diese Arbeiten konzentrierten sich im Wesentlichen auf verschiedene Zelllinien aus der T-Lymphozyten-Reihe [120] und identifizierten sowohl Caspase-abhängige als auch -unabhängige Signalwege als Mechanismen der Sulfasalazin-induzierten Apoptose [121]. Gleichzeitig wurde jedoch auch darauf hingewiesen, dass gleichartige Effekte in SW620 Kolonzellen oder primären menschlichen Synoviozyten nicht zu beobachten waren. Somit kann man eine zellspezifische Sensitivität gegenüber Sulfasalazin annehmen. Darüber hinaus scheint Sulfasalazin unterschiedliche apoptotische Signalwege innerhalb eines Zelltyps verschiedenartig beeinflussen zu können. So konnten Hermisson et al. in menschlichen malignen Gliomzellen zeigen, dass Sulfasalazin die Fas-vermittelte Apoptose hemmen kann, wohingegen die zytotoxischen Effekte des TRAIL-Todessignalwegs durch Sulfasalazin verstärkt werden. Gleichartiges beobachteten Hermisson et al. für MCF-7 Mammakarzinom-Zellen, während in HCT166 Kolonkarzinom-Zellen die Fas-Apoptose blockiert wurde, der TRAIL-Signalweg aber unbeeinflusst blieb [75]. In der hier verwendeten humanen Hepatomzelllinie HepG2 hemmte Sulfasalazin Fas-abhängige Todesmechanismen, da GCDCA den extrinsischen Apoptose-Signalweg unter Beteiligung des Fas-Todesrezeptors stimuliert [54, 159].

Die Beobachtungen an den Hepatomzellen werden durch die Ergebnisse aus der perfundierten Leber untermauert: So wirkte Sulfasalazin auch im intakten Organ zytoprotektiv gegenüber GCDCA-induzierter Leberzellschädigung und hemmte die

Gallensäuren-vermittelte Apoptose nahezu komplett (siehe **Kap. 3.2.2.2** und **3.2.2.3**). Es könnte spekuliert werden, dass Sulfasalazin einen gewissen Teil seiner Wirkung über PI₃-Kinasen-abhängige Mechanismen vermittelt, da eine Inhibition der PI₃-Kinasen den protektiven Effekt Sulfasalazins leicht abschwächte (siehe **Kap. 3.2.2.2.2**, **Abbildung 42** und **Abbildung 43**). Dies scheint aufgrund des geringen Ausmaßes der Wortmannin-Wirkung jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Sulfasalazin entfaltete seine protektive Wirkung in der vorliegenden Arbeit nicht nur gegenüber Gallensäuren-induzierter Apoptose, sondern auch gegenüber Gabe von TNF- α und Actinomycin D (siehe **Kap. 3.2.1.1.4**). Vor dem Hintergrund, dass sich verschiedenste Stimuli letzten Endes eines identischen, fest installierten Signalsystems zur Ausführung des programmierten Zelltods bedienen können [186], ist diese Beobachtung gut einzuordnen. Zwar wurde von Shanahan et al. vorgeschlagen, Sulfasalazin führe zu einer Störung der Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor [176]. Weber et al. konnten dies allerdings widerlegen, da Sulfasalazin in mit TNF- α stimulierten Zellen zwar die NF- κ B-Aktivität hemmte, die TNF- α -vermittelte Aktivierung von Erk1/2, JNK1 oder p38 jedoch nicht beeinträchtigte [210]. Ein protektiver Effekt Sulfasalazins gegenüber Actinomycin D-vermittelter Apoptose konnte auch in anderen Zelltypen gezeigt werden [75]. Es liegt also nahe zu spekulieren, dass Sulfasalazin seine antiapoptotischen Effekte zellspezifisch, aber unabhängig vom apoptotischen Stimulus entfaltet.

Die beiden Metabolite Sulfasalazins, 5-Aminosalizylsäure und Sulfapyridin, hatten keinen Effekt auf die GCDCA-induzierte Apoptose (siehe **Kap. 3.2.1.1.3**). Ähnliche Beobachtungen wurden schon in anderen Modellen gemacht. So hemmte beispielsweise nur Sulfasalazin NF- κ B in T-Zellen und Kolonepithelzellen, während seine Spaltprodukte dies nicht vermochten [203, 210]. Ebenso konnte nur Sulfasalazin Apoptose in T-Lymphozyten auslösen [120]. Offenbar scheint das Gesamtmolekül für die intrazelluläre Modulation von Signalprozessen autonome Bedeutung zu haben. Diese Beobachtung scheint von klinischer Relevanz zu sein, da nur Sulfasalazin, nicht jedoch 5-ASA, positive Eigenschaften als Basistherapeutikum bei rheumatoider Arthritis hat [89].

Mechanismen der hepatoprotektiven Wirkung:

Welcher Mechanismen bedient sich Sulfasalazin, um die Gallensäuren-induzierte Apoptose zu hemmen?

Zur Beantwortung dieser Frage ist die vorliegende Arbeit zwei verschiedenen Hypothesen nachgegangen:

1. Sulfasalazin hemmt die Aufnahme der Gallensäure GCDCA in die Hepatozyten und reduziert somit die intrazelluläre Belastung mit der Noxe GCDCA.
2. Sulfasalazin entfaltet seine Wirkung im Inneren der Zelle, möglicherweise durch Aktivierung bestimmter Überlebenssignale.

Beeinflussung der Gallensäureaufnahme:

Sulfasalazin führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Gallensäureaufnahme in die Hepatozyten (siehe **Kap. 3.2.1.2**). Da Gallensäuren-induzierte Apoptose die Aufnahme der Gallensäure in die Zelle voraussetzt [171], könnte spekuliert werden, dass dies der Hauptmechanismus der protektiven Wirkung Sulfasalazins in dem vorliegenden Modell ist. Bei differenzierter Betrachtung der Ergebnisse scheint die Hemmung der Gallensäureaufnahme jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein: 100 μM Sulfasalazin reduzierte die durch 75 μM GCDCA ausgelöste Apoptose in HepG2-Zellen deutlich (siehe **Abbildung 27**). Nimmt man nun an, dass die Gallensäureaufnahme auf 70 % reduziert war, so müssten ca. 50 μM GCDCA in die Zelle gelangt sein, waren dort allerdings nicht mehr in der Lage, zu einem deutlichen Zellschaden zu führen. Tatsächlich jedoch zeigten 50 μM der Gallensäure im Caspase-Assay eine sehr starke apoptotische Wirkung (siehe **Abbildung 26**). Daher scheint eine Reduktion der Gallensäureaufnahme als einziger Wirkmechanismus Sulfasalazins nicht ausreichend zu sein. Zudem konnte gezeigt werden, dass Sulfasalazin auch die TNF- α /Actinomycin D-induzierte Apoptose hemmt (siehe **Abbildung 31**). Daraus kann man schließen, dass ein direkter Effekt auf apoptotische Signalwege von größerer Bedeutung zu sein scheint als die Reduktion der Gallensäureaufnahme, da TNF- α /Actinomycin D-induzierte Apoptose nicht von einem funktionierenden Gallensäuretransport in die Zelle abhängig ist [113, 171].

Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Beobachtungen der Perfusionsstudien gestützt: Sulfasalazin hemmte GCDCA-induzierte Apoptose fast bis auf Kontrollniveau (siehe **Abbildung 39**), obwohl die Gallensäureaufnahme nur zu ca. 50 % reduziert war. Eine vergleichbare intrazelluläre Belastung der Leberzellen wurde bei alleiniger Gabe von GCDCA in halber Konzentration (12,5 μM versus 25 μM) erreicht, da die Gallensäure vollständig aufgenommen wurde (siehe **Abbildung 40**). Jedoch waren Leberschädigung und hepatozelluläre Apoptose bei Verwendung von 12,5 μM GCDCA signifikant stärker im Vergleich zu der Kombination von GCDCA 25 μM und Sulfasalazin (siehe **Abbildung 39**). Diese Resultate legen nahe, dass auch in der intakten Leber der wesentliche Wirkmechanismus Sulfasalazins zur Reduktion GCDCA-induzierter Leberschädigung eine Hemmung der apoptotischen Signalgebung sein muss. Die Reduktion der Gallensäureaufnahme scheint dagegen von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Aktivierung intrazellulärer, antiapoptotischer Signalmechanismen:

Verschiedene Studien konnten eine Modulation intrazellulärer Signalmechanismen durch Sulfasalazin beweisen [75, 121, 210]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Sulfasalazin in HepG2-Ntcp-Hepatomzellen den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κB aktiviert, unabhängig davon, ob die Zellen gleichzeitig mit GCDCA stimuliert werden oder keinem apoptotischen Reiz ausgesetzt sind (siehe **Kap. 3.2.1.3**). Dies steht im Kontrast zu Untersuchungen an anderen Zelltypen. Wahl et al. zeigten, dass Sulfasalazin in mikro- und millimolaren Konzentrationen ein spezifischer Inhibitor der NF- κB -Aktivierung in SW 620 Kolonzellen ist [203]. Ein vergleichbarer Effekt wurde von derselben Arbeitsgruppe auch in Lymphozyten nachgewiesen, in denen Sulfasalazin in höheren Konzentrationen neben der Blockade NF- κB -abhängiger Transkriptionsprozesse auch Apoptose induzieren konnte [120]. Als Mechanismus für die spezifische Hemmung der NF- κB -Aktivität durch Sulfasalazin wurde eine direkte Inhibition der I κB -Kinasen α und β , wahrscheinlich durch Interferenz mit deren ATP-Bindungsseite, identifiziert [210].

Da NF- κB in Hepatozyten eine starke antiapoptotische Wirkung besitzt [137, 172], könnte die beobachtete NF- κB -Aktivierung durch Sulfasalazin zur Reduktion der GCDCA-induzierten Apoptose in der vorliegenden Arbeit beitragen. Die Regulation

der NF- κ B-Signalgebung durch Sulfasalazin wurde in Hepatozyten bisher noch nicht untersucht. Interessanterweise wurden vergleichbare Beobachtungen jedoch für nichtsteroidale antiinflammatorische Substanzen (NSAID) gemacht. Obwohl NSAIDs in vielen Zelltypen zu einer Hemmung von NF- κ B führen, blieb die NF- κ B-Aktivität nach Stimulation mit einer Reihe verschiedener NSAIDs in Hepatozyten und HepG2-Zellen unbeeinflusst [31]. Daher liegt es nahe, dass auch die Effekte von Sulfasalazin auf NF- κ B zellspezifisch sind. Welche Implikationen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors letztendlich für das Überleben der Leberzellen hat und welche weiteren Mediatoren an entsprechenden Prozessen beteiligt sind, bleibt durch weitere Studien zu untersuchen. Geeignete Kandidaten für die Vermittlung einer antiapoptotischen NF- κ B-abhängigen Signalgebung wären u.a. die Mitglieder der Bcl-2-Familie [15, 207] (siehe **Kap. 1.1.2.3**) oder z.B. c-IAP2, das seine protektive Bedeutung in der Leberzelle bereits unter Beweis gestellt hat [173].

Als transkriptioneller Mechanismus könnte die NF- κ B-Signalgebung aufgrund der vierstündigen Inkubationszeit der Zellen mit Sulfasalazin in dem vorliegenden in vitro-Modell durchaus von Bedeutung sein. Die protektiven Sulfasalazin-Effekte in der perfundierten Rattenleber legen jedoch nahe, dass zusätzlich noch kurzfristig greifende, posttranskriptionelle Signalmechanismen beteiligt sein müssen.

Diverse Studien konnten zeigen, dass hydrophobe Gallensäuren oxidativen Stress innerhalb der Leberzelle auslösen [182, 183, 218]. Die Gallensäuren-induzierte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist dabei nicht nur für die Aktivierung des Fas-abhängigen extrinsischen Apoptosewegs wichtig [159], sondern wird auch als Resultat einer mitochondrialen Schädigung, somit als Bestandteil der intrinsischen Signalmechanismen, beobachtet [183]. Unter den ROS-induzierenden hydrophoben Gallensäuren befinden sich auch TCDCA und GCDCA [159]. Interessanterweise wird Sulfasalazin eine Rolle als Radikalfänger für toxische ROS zugeschrieben [9, 68, 136]. Somit könnte also spekuliert werden, dass Sulfasalazin GCDCA-induzierte Apoptose durch Elimination neu entstandener ROS und damit durch Eingriff in die extrinsische und intrinsische apoptotische Signalgebung inhibiert.

Beeinflussung der Cholestase:

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, dass der cholestatische Effekt hydrophober Gallensäuren durch Sulfasalazin antagonisiert werden kann (siehe **Kap. 3.2.2.1.3**). Da der Gallenfluss nach Zugabe von Sulfasalazin in der Gruppe der hohen GCDCA-Konzentration (25 μM) dabei stärker war als in derjenigen mit halber Dosis (12,5 μM), und sogar höher war als bei alleiniger Sulfasalazin-Applikation, könnte man annehmen, dass Sulfasalazin der Toxizität von GCDCA entgegenwirkt und dadurch die vormals erhebliche cholestatische Eigenwirkung der Gallensäure in eine choloretische umwandelt. Dies wäre nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern möglicherweise auch von klinischer Relevanz, da der medikamentöse Einsatz Sulfasalazins in verschiedenen Bereichen bereits etabliert ist und man auf langjährige Erfahrungen im Umgang mit dieser Substanz zurückblicken kann [10, 64, 89, 102].

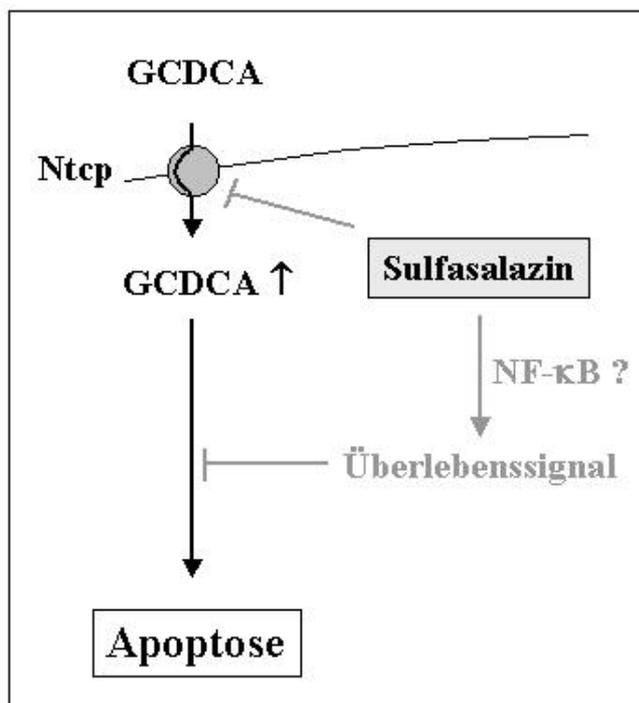


Abbildung 45:

Potentielle Mechanismen der protektiven Wirkung von Sulfasalazin in Leberzellen

Praktische Relevanz dieser Ergebnisse

Die protektiven Effekte von Sulfasalazin, die in der vorliegenden Arbeit erstmals an Hepatozyten beobachtet wurden, waren im *in vitro*-Modell in den Konzentrationen 100 und 1000 μM am deutlichsten ausgeprägt. Parallel dazu wirkten 100 μM Sulfasalazin in der intakten Leber ausgeprägt antiapoptotisch und anticholestatisch. Es stellt sich daher die Frage, welche Konzentrationen in Patienten erreicht werden können, die mit Sulfasalazin behandelt werden. Frühe Studien zeigten, dass im Serum der behandelten Patienten nach oraler Gabe von Sulfasalazin Spitzenkonzentrationen von ca. 100 μM Sulfasalazin erreicht werden [174]. Da Sulfasalazin enterohepatisch zirkuliert, liegt die Konzentration von Sulfasalazin in der Pfortader, die ausschlaggebend für die Konzentration innerhalb des Hepatozyten ist, vermutlich sogar höher [102].

Sulfasalazin und 5-Aminosalizylsäure sind Alternativen in der medikamentösen Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Eine Mitbeteiligung der Leber ist bei diesen Erkrankungen nicht ungewöhnlich. So liegt bei ca. 5 % der Patienten mit Colitis ulcerosa gleichzeitig eine primär sklerosierende Cholangitis (PSC) vor, umgekehrt jedoch ist eine PSC zu ca. 75 % mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung vergesellschaftet [158]. Im Rahmen cholestatischer Leberkrankheiten wie der PSC kommt es, möglicherweise durch autoimmune Mechanismen, zu gesteigertem Zelluntergang in der Leber. Der immunmodulatorische Effekt Sulfasalazins ist bereits gut belegt [120, 121]. Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen legen nun nahe, dass Sulfasalazin Leberzellschädigung hemmen kann und somit hepatoprotektiv wirkt. Patienten mit chronischen cholestatischen Leberkrankheiten könnten also möglicherweise zweifach von einem therapeutischen Einsatz Sulfasalazins profitieren.

Die neuartigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen die Grundlage für weiterführende Untersuchungen dar, die die klinische Anwendbarkeit der hier aufgezeigten neuen therapeutischen Ansätze zur Verringerung der Leberzellschädigung bei Cholestase zu überprüfen haben. Die vorliegende Arbeit ist somit von potentieller Bedeutung für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien bei cholestatischen Leberkrankheiten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hydrophobe Gallensäuren führen in der cholestatischen Leber zu Zellschädigung und Apoptose. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, weiteren Einblick in die Mechanismen der durch die quantitativ bedeutendste hydrophobe Gallensäure des Menschen, Chenodeoxycholsäure, induzierten Leberzellschädigung und deren Antagonisierung durch endogene und exogene Stimuli zu verschaffen und somit mögliche Ansatzpunkte neuer Therapiestrategien chronischer cholestatischer Leberkrankheiten aufzuzeigen.

Der erste Teil dieser Arbeit untersucht die Rolle der PI₃-Kinasen in der Vermittlung Chenodeoxycholsäure (CDCA)-induzierten Zellschadens in der intakten Leber: Hierzu wurden im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber die Effekte des Taurin- und des Glycinkonjugates von CDCA, TCDCA und GCDCA, auf Leberzellschädigung, Apoptose, Gallenfluss, Sekretion organischer Anionen und Aktivierung der Proteinkinase B in An- und Abwesenheit des PI₃-Kinasen-Inhibitors Wortmannin untersucht. Messung der Aktivitäten von LDH und GPT im hepatovenösen Effluat gaben Auskunft über die Leberzellschädigung. Immunhistochemische Darstellung der aktivierten Caspase 3 und des Zytokeratin 18-Filaments im Lebergewebe erfassten das Ausmaß der hepatozellulären Apoptose. Cholestatische und choloretische Einflüsse wurden durch gravimetrische Bestimmung der Gallensekretion und durch photometrische Messung der Konzentration des Mrp2-Modellsubstrats GS-DNP in der Galle gewährleistet. Mittels Western Blot wurde die phosphorylierte Form der PKB als Indikator einer Aktivierung der PI₃-Kinasen im Leberhomogenat gemessen. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

TCDCA führte zu moderater Leberzellschädigung durch Apoptose, darüber hinaus aber zu einer spürbaren Reduktion von Gallenfluss und GS-DNP-Sekretion. Außerdem kam es zu einer starken Aktivierung der PKB. Inhibition der PI₃-Kinasen durch Wortmannin hemmte die PKB-Aktivierung, verstärkte TCDCA-induzierten Leberzellschaden und Apoptose und schien auch den cholestatischen Effekt der Gallensäure zu steigern. Daraus kann gefolgert werden, dass die Gallensäure TCDCA ihre Toxizität und cholestatische Potenz in der intakten Leber durch Aktivierung PI₃-Kinasen-abhängiger Mechanismen abschwächen kann.

Im Gegensatz zum Taurin-Konjugat induzierte GCDCA in äquimolarer Konzentration extensiven Leberschaden durch hepatozelluläre Apoptose, gleichzeitig auch einen wesentlich stärkeren Rückgang von Gallenfluss und Mrp2-Transport. GCDCA führte zu keiner ausgeprägten Aktivierung der PKB. Im Unterschied zu seiner Wirkung in TCDCA-behandelten Lebern reduzierte der PI₃-Kinasen-Hemmer Wortmannin GCDCA-induzierte Leberschädigung und Apoptose. Der starke cholestatische Effekt von GCDCA schien durch Wortmannin verstärkt zu werden. Man könnte somit spekulieren, dass GCDCA-induzierter Leberzellschaden in der intakten Leber teilweise über PI₃-Kinasen-abhängige Mechanismen vermittelt wird.

Die Ergebnisse des ersten Abschnitts der Arbeit zeigen, dass das Taurin- und das Glycin-Konjugat der CDCA in der intakten Leber unterschiedliche Toxizität aufweisen. Diese Beobachtung ist zumindest teilweise über eine unterschiedliche Rolle der PI₃-Kinasen in der Signalgebung der beiden Gallensäuren zu erklären. Während TCDCA simultan PI₃-Kinasen-abhängige Überlebenssignale zu aktivieren scheint, die ihre schädigende Wirkung antagonisieren, scheint GCDCA die Lipidkinasen an der Vermittlung seiner starken Toxizität über bislang noch unbekannte Mechanismen zu beteiligen.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Beeinflussung Gallensäuren-induzierten Leberzellschadens durch das Apoptose modulierende Sulfasalazin *in vitro* und in der intakten Leber. Zunächst wurden die Effekte Sulfasalazins und seiner Spaltprodukte 5-Aminosalizylsäure und Sulfapyridin im Modell Ntcp-transfizierter menschlicher HepG2-Hepatomzellen untersucht: Apoptose wurde mittels eines Caspase 3-Assays sowie immunzytochemisch erfasst. Die Gallensäureaufnahme wurde mit Hilfe radiochemisch markierter Taurocholsäure bestimmt. Ein Luciferase-Reportergen-Assay diente der Messung der Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF-κB. Im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber wurde die Wirkung Sulfasalazins auf die GCDCA-induzierten Veränderungen von Leberzellschädigung, Apoptose, Gallenfluss und Gallensäureaufnahme untersucht. Im Wesentlichen wurden die gleichen Methoden wie in Teil 1 dieser Arbeit verwendet (siehe oben). Die Gallensäureaufnahme wurde indirekt über eine gaschromatographische Messung der Gallensäurenkonzentration im hepatovenösen Effluat erfasst.

GCDCA wirkte in HepG2-Ntcp-Zellen stärker apoptotisch als TCDCA in äquimolaren Konzentrationen. Gabe von Sulfasalazin führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der GCDCA-vermittelten sowie der Gallensäuren-unabhängigen, TNF- α /Actinomycin D-induzierten Apoptose. Die Sulfasalazin-Spaltprodukte 5-Aminosalizylsäure und Sulfapyridin hatten keinen Effekt. Darüber hinaus reduzierte Sulfasalazin im Gegensatz zu seinen Spaltprodukten auch die Gallensäureaufnahme in die Leberzellen mit zunehmender Konzentration. Ebenso aktivierte das Gesamtmolekül den Transkriptionsfaktor NF- κ B in An- und Abwesenheit von GCDCA.

In der perfundierten Rattenleber konnte die GCDCA-induzierte massive Zellschädigung und Apoptose durch Sulfasalazin deutlich gehemmt werden, der cholestatische Effekt der Gallensäure wurde ebenfalls antagonisiert. Eine zusätzliche Hemmung der PI₃-Kinasen mittels Wortmannin schwächte den zytoprotektiven Effekt Sulfasalazins leicht, die anticholestatische Wirkung jedoch deutlich ab. Sulfasalazin führte auch in der intakten Leber zu einer Reduktion der Gallensäureaufnahme.

Die Ergebnisse des zweiten Teils der Arbeit zeigen, dass Sulfasalazin *in vitro* und in der intakten Leber GCDCA-induzierte Apoptose potent hemmen kann. Mögliche Wirkmechanismen dabei sind eine partielle Reduktion der Gallensäureaufnahme und vor allem die Aktivierung intrazellulärer Überlebenssignale, die u.a. über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt werden könnten.

Die neuartigen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit tragen zum Verständnis der komplexen Signalgebung im Rahmen cholestatischer Leberschädigung und seiner Antagonisierung bei und sind somit von potentieller Bedeutung für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien bei cholestatischen Leberkrankheiten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
2. Aki T, Mizukami Y, Oka Y, Yamaguchi K, Uemura K, Fujimiya T, Yoshida K. Phosphoinositide 3-kinase accelerates necrotic cell death during hypoxia. *J Biochem* 2001; 358: 481-487.
3. Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, Mizukami Y. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene* 2003; 22(52): 8529-8535.
4. Alnemri E, Livingston SDJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171-175.
5. Alpini G, Baiocchi L, Glaser S et al. Ursodeoxycholate and tauroursodeoxycholate inhibit cholangiocyte growth and secretion of BDL rats through activation of PKC alpha. *Hepatology* 2002; 35: 1041-1052.
6. Ambrosi G, Adida C, Altieri D. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921.
7. Antwerp DJV, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma , IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 787-789.
8. Arcaro A, Khanzada UK, Vanhaesebronk B, Tetley TD, Waterfield MD, Seckl MJ. Two distinct phosphoinositide 3-kinases mediate polypeptide growth factor-stimulated PKB activation. *EMBO J* 2002; 21(19): 5097-5108.

9. Aruom OL, Wasil M, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The scavenging of oxidants by sulfasalazine and its metabolites. A possible contribution to their anti-inflammatory effects? *Biochem Pharmacol* 1987; 36(21): 3739-3742.
10. Azad Khan AK, Piris J, Truelove SC. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet* 1977; 2(8044): 892-895.
11. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
12. Bajt ML, Lawson JA, Vonderfecht SL, Gujral JS, Jaeschke H. Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and non-parenchymal cells by a caspase-8 inhibitor in vivo: evidence for a postmitochondrial processing of caspase-8. *Toxicol Sci* 2000; 58: 109-117.
13. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 17: 3261-3270.
14. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-681.
15. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transkription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001; 107: 241-246.
16. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784.
17. Benz C, Angermuller S, Tox U, et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol* 1998; 28(1): 99-106.
18. Beraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 429-434.

19. Bergmeyer HU, Bernt E. Lactate dehydrogenase. Methods of enzymatic analysis. Vol. 3. New York: Academic Press Inc., 1983:574-579.
20. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. Eur J Biochem 1999; 264: 678-701.
21. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A et al. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. Hepatology 2001; 33: 1206-1216.
22. Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. Hepatology 1998; 28: 1449 -1453.
23. Beuers U, Denk GU, Soroka CJ, Wimmer R, Rust C, Paumgartner G, Boyer JL. Tauroolithocholic acid exerts cholestatic effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets. J Biol Chem 2003; 278(20): 17810-17818.
24. Beuers U, Fischer S, Spengler U, Paumgartner G. Formation of iso-ursodeoxycolic acid during administration of ursodeoxycholic acid in man. J Hepatol 1991; 13: 97-103.
25. Beuers U, Nathanson MH, Isales CM, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca⁺⁺ mechanisms defective in cholestasis. J Clin Invest 1993; 92: 2984 - 2993.
26. Beuers U, Soroka C, Denk GU et al. Tauroolithocholic acid impairs hepatocellular bile acid and organic anion secretion by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. Hepatology 2001; 34.

27. Beuers U, Spengler U, Kruis W et al. Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 1992; 16: 707-714.
28. Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS et al. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1996; 110: 1553-1563.
29. Bolder U, Ton-Nu H-T, Schteingart CD, Frick E, Hofmann AF. Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterology* 1997; 112: 214-225.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
31. Callejas NA, Casado M, Bosca L, Martin-Sanz P. Absence of nuclear factor kappaB inhibition by NSAIDs in hepatocytes. *Hepatology* 2002; 35(2): 341-348.
32. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573): 1655-1657.
33. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64: 281-302.
34. Cardone MH, Roy M, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318-1321.
35. Cikala M, Wim B, Hobmayer E, Bottger A, David C. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* 1999; 9: 959-962.
36. Combes B, Markin RS, Wheeler DE et al. The effect of ursodeoxycholic acid on the florid duct lesion of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 30: 602-605.

37. Cowling V, Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Diff* 2002; 9: 1046-1056.
38. Crawford JM. Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 169-189.
39. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341(Pt2): 233-249.
40. Das KM, Chowdhury JR, Zapp B, Fara JW. Small bowel absorption of sulfasalazine and its hepatic metabolism in human beings, cats and rats. *Gastroenterology* 1979; 77: 280-284.
41. Das KM, Eastwood MA, McManus JPA, Sircus W. The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis. *Gut* 1973; 14: 631-641.
42. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13(22): 2905-2927.
43. Datta SR, Dudek H, Tao X, Master S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-241.
44. De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates proapoptotic JNK signaling. *Nature* 2001; 414: 308-313.
45. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-303.

46. Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, et al. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 1996; 86(5): 777-786.
47. Domin J, Gaidarow I, Smith MEK, Keen JH, Waterfield MD. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2a is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem* 2000; 275(16): 11943-11950.
48. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42.
49. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996; 15: 2685-2689.
50. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Binbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275: 661-665.
51. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufman SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
52. Egushi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57: 1835-1840.
53. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.

54. Faubion W, Guicciardi M, Miyoshi H et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999; 103: 137-145.
55. Feldmann G. Liver apoptosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1-11.
56. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, et al.: Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mrp2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* 2002; 123(4): 1238-1251.
57. Fischer C, Klotz U.: High-performance liquid chromatographic determination of aminosalicylate, sulfapyridine and their metabolites - its application for pharmacokinetic studies with salicylazosulfapyridine in man. *J Chromatogr* 1979; 162: 237-243.
58. Folli F, Alvaro D, Gigliozzi A, Bassotti C, Kahn CR, Pontiroli AE, Capocaccia L, Jezequel AM, Benedetti A. Regulation of endocytotic-transcytotic pathways and bile secretion by phosphatidylinositol 3-kinase in rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 954-965.
59. Foukas LC, Daniele N, Ktori C, Anderson KE, Jensen J, Shepherd PR. Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinases and protein kinase activities. *J Biol Chem* 2002; 277(40): 37124-37130.
60. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKT ion blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88: 435-437.
61. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996; 85: 781-784.
62. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 481-507.

63. Fukumoto Y, Murakami F, Tateishi A, Itoh Y, Sakaida I, Okita K. Effects of secretin on TCDCA- or TDCA-induced cholestatic liver injury in the rat. *Hepatol Res* 2002; 22(3): 214-222.
64. Gaginella TS, Walsh RE. Sulfasalazine: multiplicity of action. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 801-812.
65. Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 1996; 87: 781-784.
66. Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, et al. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1996; 110: 199-209.
67. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260.
68. Gionchetti P, Guarnieri C, Campieri M, Bellusgi A, Brignola C, Tannone P, Miglioli M, Barbara C. Scavenger effect of sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid, and osalazine on superoxide radical generation. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 174-178.
69. Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Haussinger D. Tauro lithocolic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in an c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 2002; 122: 1411-1427.
70. Green RM, Beier D, Gollan JL. Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. *Gastroenterology* 1996; 111: 193-198.
71. Guldutuna S, Zimmer G, Imhof M et al. Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterology* 1993; 104: 1736-1744.

72. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569-3577.
73. 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: 1149-1156.
74. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
75. Hermisson M, Weller M. NF-kappa B-independent actions of sulfasalazine dissociate the CD95L- and Apo2L/TRAIL-dependent death signaling pathways in human malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2003; 10: 1078-1089.
76. Heuman DM. Hepatoprotective properties of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1993; 104: 1865-1870.
77. Heuman DM, Bajaj R. Ursodeoxycholate conjugates protect against disruption of cholesterol- rich membranes by bile salts. *Gastroenterology* 1994; 106: 1333-1341.
78. Heuman DM, Bajaj RS, Lin Q. Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *J Lipid Res* 1996; 37: 562-573.
79. Heuman DM, Mills AS, Mc Call 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: 203-211.
80. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y et al. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 38610-38618.

81. Higuchi H, Yoon JH, Gramlichler A, Werneberg N, Bronk SF, Gores GJ. Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 454-461.
82. Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF, Hsuan JJ, Courtneidge SA, Parker PJ, Waterfield MD. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 1992; 70: 419-429.
83. Hofmann AF. Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* 1984; 4(5 Suppl): 4S-14S.
84. Hofmann AF. Bile Acids. *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press, 1988.
85. Hofmann AF. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994; 204: 1-15.
86. Hoult JR. Pharmacological and biochemical actions of sulphasalazine. *Drugs* 1986; 32: 18-26.
87. Jansen JA. Kinetics of the binding of salicylazosulfapyridine to human serum albumine. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1977; 41: 401-416.
88. Javitt J. Cholestasis in rats induced by tauroolithocholate. *Nature* 1966; 210: 1262-1263.
89. Jones G, Halbert J, Crotty M, Shanahan EM, Batterham M, Ahern M. The effect of treatment on radiological progression in rheumatoid arthritis: a systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(1): 6-13.
90. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida

- H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549-554.
91. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *J Curr Biol* 1998; 8: 1001-1008.
92. Kanda H, Miura M. Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem* 2004; 136(1): 1-6.
93. Kapeller R, Chakrabarti R, Cantley L, Fay F, Corvera S. Internalization of activated platelet-derived growth factor receptor-phosphatidylinositol-3' kinase complexes: potential interactions with the microtubule cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 1993; 13(10): 6052-6063.
94. Kennedy S, Wagner A, Conzen S et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes & Dev* 1997; 11: 701-713.
95. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5800-5810.
96. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
97. Khan AKA, Truelove SC, Aronson JK,. The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 13: 532-528.
98. Kim AH, Khursigara GJ, Hundal HS. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 893-901.

99. Kischel FC, Lawrence DA, Tinel A, Leblanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001; 276: 46639-46646.
100. Kitani K, Kanai S, Sato Y, Ohta M. Tauro alpha-muricholate is as effective as tauro beta-muricholate and tauroursodeoxycholate in preventing taurochenodeoxycholate-induced liver damage in the rat. *Hepatology* 1994; 19(4): 1007-1012.
101. Kitani K, Ohta M, Kanai S. Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat. *Am J Physiol* 1985; 248: G407-G417.
102. Klotz U. Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid. *Clin Pharmacokinet* 1985; 10(4): 285-302.
103. Kluck R, Bossy-Wetzel E, Green D, Newmeyer D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-1136.
104. Koga H, Sakisaka S, Ohishi M et al. Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997; 25: 1077-1084.
105. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localize to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 1999; 29: 1156-1163.
106. Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. Toxicity of bile acid on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 1994; 19: 471-479.
107. Kroemer G. The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv Immunol* 1995; 58: 211-296.

108. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18: 44-51.
109. Kroemer G RJ, . Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6: 513-519.
110. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8247-8254.
111. Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 2000; 32: 3-18.
112. Kurz AK, Block C, Graf D, Dahl SV, Schliess F, Haussinger D. Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. *Biochem J* 2000; 350: 207-213.
113. Lasek W, Giermasz A, Kuc K, Wankowicz A, Feleszko W, Golab J, Zagozdzon R, Stoklosa T, Jakobisiak M. Potentiation of the anti-tumor effect of actinomycin D by tumor necrosis factor alpha in mice: correlation between in vitro and in vivo results. *Int J Cancer* 1996; 66(3): 374-379.
114. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin response? *J Cell Sci* 2001; 114: 2903-10.
115. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid: mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders. *J Hepatol* 2001; 35: 134-146.
116. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosin triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Exp Med* 1997; 185: 1481-1486.
117. Leuschner U, Fischer H, Kurtz W et al. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989; 97: 1268-1274.

118. Leuschner U, Leuschner M, Sieratzki J et al. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up. A pilot study. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 642-649.
119. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95-99.
120. Liptay S, Bachem M, Hacker G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM. Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1361-1369.
121. Liptay S, Fulda S, Shanbacher M, Bourteele S, Ferri KF, Kroemer G, Adler G, Debatin KM, Schmid R. Molecular mechanisms of sulfasalazine-induced T-cell apoptosis. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 608-620.
122. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda J, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379: 349-353.
123. Liu H, Lo CR, Czaja MJ. NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology* 2002; 35: 772-778.
124. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157.
125. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89(2): 175-84.

126. MacFarlan M, Merrison W, Dinskale D, Cohen MG. Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 148: 1239-1254.
127. Maher J. What doesn't kill you makes you stronger: How Hepatocytes survive prolonged cholestasis. *Hepatology* 2004; 39(4): 1141-1143.
128. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284: 1362-1365.
129. Martinou JC. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 1999; 399: 411-412.
130. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Mol Cell Biol* 2001; 2: 63-71.
131. McConkey M, Gillin H, Webster CR, Anwer MS. Cross-talk between Protein Kinases C(zeta) and B in Cyclic AMP-mediated Sodium Taurocholate CO-transporting Polypeptide Translocation in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(20): 20882-20888.
132. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407: 796-801.
133. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 2000; 276: 16391-16398.
134. Misra S, Ujhazy P, Gatmaitan Z, Varticovski L, Arias IM. The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J Biol Chem* 1998; 271(41): 26638-26644.
135. Misra S, Ujhazy P, Varticovski L, Arias IM. Phosphoinositide 3-kinase lipid products regulate ATP-dependent transport by sister of P-glycoprotein and

- multidrug resistance associated protein 2 in bile canalicular membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(10): 5814-5819.
136. Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y. Effect of sulphasalazine and its metabolites on the generation of reactive oxygen species. Gut 1994; 28: 190-195.
137. Miyoshi H, Rust C, Guicciardi ME, Gores GJ. NF-kappaB is activated in cholestasis and functions to reduce liver injury. Am J Pathol 2001; 158: 967-975.
138. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. Gastroenterology 1999; 117(3): 669-677.
139. Muzio M, Stickwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. J Biol Chem 1998; 273: 2926-2930.
140. Nagaki M, Sugiyama A, Osawa Y, Naiki T, Nakashima S, et al. Lethal hepatic apoptosis mediated by tumor necrosis factor receptor, unlike Fas-mediated apoptosis, requires hepatocyte sensitization in mice. J Hepatol 1999; 31: 997-1005.
141. Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 3537-3542.
142. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74: 609-619.
143. Ono F, Nakagawa T, Saito S, Owada Y, Sakagami H, Goto K, Suzuki M, Matsuno S, Kondo H. A novel class II phosphoinositide 3-kinase predominantly

- expressed in the liver and its enhanced expression during liver regeneration. *J Biol Chem* 1998; 273(13): 7731-7736.
144. Oswald M, Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1998; 28: 544A.
145. Palombella V, Rando A, Goldberg A, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; 78: 773-785.
146. Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-Flip expression in tumor cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 6893-6896.
147. 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. *J Hepatol* 2000; 32: 561-566.
148. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999; 284: 1365-1368.
149. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21: 1725-1741.
150. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 105-114.
151. Peppercorn MA, Goldmann P. Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. *Gastroenterology* 1973; 64: 240-245.

152. Pieniaszek HJ, Bates TR. Capacity-limited gut wall metabolism of 5-aminosalicylic acid, a therapeutically active metabolite of sulfasalazine, in rats. *J Pharm Sci* 1979; 68: 1323-1325.
153. Poupon R, Chretien Y, Poupon RE et al. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987; 1: 834-836.
154. Poupon RE, Poupon R, Balkau B. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 1994; 330: 1342-1347.
155. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G, Vlahos CJ. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 1994; 54: 2419-2423.
156. Qiao L, Yacoub A, Studer E et al. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology* 2002; 35: 779-789.
157. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356(6368): 397-400.
158. Rasenack J, Gerok W. Primär biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis und Syndrome mit Schwund der Gallengänge. In: Gerok W, Blum HE, ed. *Hepatologie*. Vol. 2. München: Urban & Schwarzenberg, 1995:635-650.
159. Reinehr R, Graf D, Häussinger D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 2003; 125: 839-853.
160. Roberts L, Gores G. The role of hepatocyte apoptosis in liver diseases and growth regulation. *Progr Liver Dis* 1997; 15: 57-83.

161. Rodriguez CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1998; 4: 165-178.
162. Rodriguez CM, Steer CJ. Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. *Gastroenterology* 1999; 117(3): 732-736.
163. Rodriguez CM FG, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998; 101(12): 2790-2799.
164. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Dev* 1999; 13: 3179-3184.
165. Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is target of Akt in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* 1999; 401(6748): 86-90.
166. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914-6925.
167. Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ. The bile acid taurochenodesoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2000; 275: 20210-20216.
168. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-99.
169. Schmid RM, Adler G. NF-kappa B/Rel/I kappa B: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2000; 118: 1208-1228.

170. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S et al. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990; 12: 1216-1221.
171. Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poestral K, Haisma HJ, Jansen PLM, Moshage H. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* 2004; 39: 1563-1573.
172. Schoemaker MH, Gommans WM, Conde de la Rosa L, Homan M, Klok P, Trautwein C, van Goor H, Poestral K, Haisma HJ, Jansen PLM, Moshage H. Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation. *J Hepatol* 2003; 39: 153-161.
173. Schoemaker MH, RoS JE, Homan M, Trautwein C, Liston P, Poelstra K, Van Goor H, Jansen PI, Moshage H. Cytokine regulation of pro- and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF-kappaB-regulated inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) prevents apoptosis. *J Hepatol* 2002; 36: 742-750.
174. Schroder H, Campbell DES. Absorption, metabolism and excretion of salicylazosulfapyridine in man. *Clin Pharmacol Ther* 1972; 13: 539-551.
175. Schroder H, Lewkonja RM, Evans DAP. Metabolism of salicylazosulfapyridine in healthy subjects and in patients with ulcerative colitis. *Clin Pharmacol Ther* 1973; 14: 802-809.
176. Shanahan F, Niederlehner A, Carramanzana N, Anton P. Sulfasalazine inhibits the binding of TNF alpha to its receptor. *Immunopharmacology* 1990; 20: 217-224.
177. Shimoke K, Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. Synthetic lipid products of PI3-kinase which are added to culture medium prevent low K⁺-induced apoptosis of

- cerebellar granule neurons via Akt kinase activation. FEBS Lett 1998; 437(3): 221-224.
178. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappaB. Annu Rev Cell Biol 1994; 10: 405-455.
179. Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrom P-450 systems. Methods Enzymol 1978; 52: 48-59.
180. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP et al. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. Cell 1993; 75: 451-462.
181. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000; 278: G992-G999.
182. Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumprich E, Elkins N, Everson G. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. Pediatr Res 2001; 49: 519-531.
183. Sokol RJ, Winkelhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. Gastroenterology 1995; 109: 1249-1256.
184. Stellaard F SM, Sauerbruch T, Paumgartner G. Simultaneous determination of cholic acid and chenodeoxycholic acid pool sizes and fractional turnover rates in human serum using ¹³C-labeled bile acids. J Lipid Res 1984; 25: 1313-1319.
185. Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein bg subunits. Cell 1994; 77: 83-93.

186. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-245.
187. Sulston J, Du Z, Thomas K, Wilson R, Hillier L, Staden R, Halloran N, Green P, Thierry-Mieg J, Qiu L, et al. The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature* 1992; 356: 37-41.
188. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.
189. Svartz N. Ett nytt sulfonamidpreparat. Forelopande meddelande. *Nord Med* 1941; 9: 544.
190. Takahashi A, Earnshaw WC. ICE-related proteases in apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 50-55.
191. Takikawa Y, Miyoshi H, Rust C, et al. The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits fas apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes. *Gastroenterology* 2001; 120(7): 1810-1817.
192. Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 2001; 414: 313-317.
193. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
194. Tiranti V, Rossi E, Ruiz-Carrillo A, Rossi G, Rocchi M, DiDonato S, Zuffardi O, Zeviani M. Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics* 1995; 25: 559-564.

195. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; 387: 673-676.
196. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, et al. The rat canalicular conjugate export pump (mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 1997; 113: 255-264.
197. Trauner M, Boyer JL. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function and Regulation. *Physiol Rev* 2003; 83: 633- 671.
198. Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 2002; 277(16): 14040-14047.
199. Van Nieuwkerk CMJ, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GNJ, Dingemans KP, van den Bergh Weerman MA, Offerhaus GJA. Effects of ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted mdr2 P-glycoprotein gene. *Gastroenterology* 1996; 111: 165-171.
200. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999; 253: 239-254.
201. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vadenabeele P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *Exp Med* 1998; 187: 1477-1485.
202. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53.
203. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998; 101: 1163-1174.

204. Wahllander A, Sies H. Glutathione S-conjugate formation from 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and biliary S-conjugate excretion in the perfused rat liver. *Eur J Biochem* 1979; 96: 441-446.
205. Wajant H SP. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 19-32.
206. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331-367.
207. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baltimore D. NF-kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683.
208. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13884-13888.
209. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2000; 15: 2922-2933.
210. Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid R. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 2000; 119: 1209-1218.
211. Webster CR, Anwer MS. Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1): G1165-1172.
212. Webster CR, Blanch CJ, Phillips J, Anwer MS. Cell swelling-induced translocation of rat liver Na(+)/taurocholate cotransport polypeptide is mediated

- via the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 2000; 275(38): 29754-29760.
213. Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayoton G. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 1996; 16(4): 1722-1733.
214. Xu Y, Bialik S, Jones BE, Limuro Y, Kitsis RN, Srinivasan A, et al. NF-kappaB inactivation converts a hepatocyte cell line TNF-alpha response from proliferation to apoptosis. *Am J Pathol* 1998; 275: C1058-C1066.
215. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
216. Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 25846-25856.
217. Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; 267(5206): 2003-2006.
218. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001; 33: 616-626.
219. Yoon JH, Gores GJ. Death-receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol* 2002; 37(3): 400-410.
220. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK alpha and IKK beta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91: 243-252.

221. Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 1997; 272(39): 24101-24104.
222. Zhan M, Zhao H, Han ZC. Signalling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol* 2004; 19(3): 973-983.
223. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001; 3(11): 973-982.
224. Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochem Biophys Acta* 2001; 1551: F1-F37.
225. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C.elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413.
226. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An Apaf-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549-11556.

7 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

5-ASA	5-Aminosalizylsäure
Act.D	Actinomycin D
A.E.	Arbiträre Einheit
AIF	Apoptosis inducing factor
Akt	Serin-Threonin Kinase Akt = PKB
Apaf-1	Apoptotic protein activating factor-1
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	Bile salt export pump
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CDNB	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
CK 18	Zytokeratin 18
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-R	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EndoG	Endonuklease G
FADD	Fas associated death domain protein
FCS	Fetales Kälberserum
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS-DNP	2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion
IAP	Inhibitor of apoptosis protein

IC ₅₀	Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung eines Enzyms erzielt wird
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
Mdr2	Multidrug resistance protein 2
Mdr3	Multidrug resistance protein 3
MEM	Minimal essential medium
MPT	Mitochondrial permeability transition
Mrp1	Multidrug resistance-associated protein 1
Mrp2	Multidrug resistance-associated protein 2
Mrp3	Multidrug resistance-associated protein 3
MW	Mittelwert
NF- κ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor κ B
NIK	NF- κ B-inducing kinase
Ntcp	Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide
Oatp	Organic anion transporting polypeptide
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polmerase
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate-buffered solution
PDK 1	Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1
PI ₃ -Kinase/PI ₃ K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTP	Permeability transition pore
RIP	Receptor-interacting protein
RLU	Relative light units
ROS	Reaktive Sauerstoffmetabolite
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPD	Sulfapyridin
SSZ	Sulfasalazin = Salizylazosulfapyridin

TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TLCA	Taurolithocholsäure
TMS-Reagens	Trimethylsilylreagens
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF-2	TNF-associated factor-2
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure
WT	Wortmannin

8 LEBENS LAUF

Kris Benjamin Bauchmüller

geboren am: 5. Juli 1977
Geburtsort: Mannheim

Schulbildung

1983 - 1987 Grundschule Raubling
1987 - 1996 Finsterwalder Gymnasium Rosenheim, Abitur

Zivildienst

1996 - 1997 Malteser Hilfsdienst Rosenheim: Rettungsdienst, Ausbilder

Studium

1997 - 2004 Ludwig-Maximilians-Universität München
4/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

4/2003 – 8/2003 Klinikum für Kinder und Jugendliche Augsburg
8/2003 – 11/2003 Klinikum der Universität München, Medizinische Kliniken und
Polikliniken II und III - Großhadern
11/2003 – 2/2004 Northern General Hospital Sheffield, UK

Dissertation

2002 – 2005 Anfertigung der vorliegenden Promotionsschrift im Labor für
hepatobiliäre Forschung; Medizinische Klinik II, Klinikum der
Universität München – Großhadern, Prof. Dr. med. Ulrich Beuers
und Dr. med. Christian Rust

5/2004 Teilapprobation als Arzt i. P.

10/2004 Approbation als Arzt

9 DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2002 bis Januar 2005 im Labor für hepatobiliäre Forschung, Prof. Dr. med. Ulrich Beuers, der Medizinischen Klinik II am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München-Großhadern angefertigt. Ihr Gelingen verdanke ich der großartigen Unterstützung aller Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Laborteams. Die immunhistochemischen Präparate wurden in Zusammenarbeit mit den Abteilungen für Medizin und Pathologie der Karl-Franzens-Universität in Graz angefertigt und beurteilt.

Mein erster Dank gilt Herrn Ralf Wimmer, der mich fantastisch und mit großem Engagement in die verschiedenen Methoden eingewiesen hat. Seine Unterstützung bei der Versuchsdurchführung war eine großartige Hilfe, und sein hervorragendes Fachwissen trug maßgeblich zum Erzielen und Interpretieren der vorliegenden Ergebnisse bei. Für die erstklassige und freundschaftliche Hilfe bei den Untersuchungen im Zellmodell möchte ich mich bei Herrn Timo Vennegeerts bedanken, der durch seine vielen guten Ideen und Anregungen großen Anteil an der Fertigstellung des Projektes hat. Bei unserer Laborleiterin Frau Gudrun Schwertfeger bedanke ich mich für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Gallensäuren-Analytik. Darüber hinaus jedoch gilt meine ganze Dankbarkeit auch ihrer offenen und ungewöhnlich warmherzigen Art, in der sie mich in allen Dingen begleitet und konstruktiv unterstützt hat.

Frau Andrea Fuchsbichler danke ich für die freundliche, tatkräftige und kompetente Hilfe bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate während meines Aufenthaltes in Graz.

Bei Frau Carola Drewnick möchte ich mich für ihre großartige Hilfe bei der Durchführung der Western Blots bedanken. Herrn Simon Hohenester und Herrn Dr. med. Gerald Denk danke ich für die Unterstützung beim Erlernen der Operationstechnik.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Gustav Paumgartner möchte ich mich herzlich für die hervorragende konstruktive Kritik an den Ergebnissen und seine offene Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ich danke allen Mitgliedern des Labors für die tatkräftige und sorgfältige Unterstützung bei den Perfusionsversuchen: Ihr verantwortungsvoller und respektvoller Umgang mit den Tieren ermöglichte den Erfolg der Experimente mit einer möglichst geringen Anzahl an Versuchstieren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Beuers und Herrn Dr. med. Christian Rust. Ihrer außergewöhnlich engagierten und professionellen Projektbetreuung habe ich die Freude an der Forschung und das Gelingen dieser Arbeit zu verdanken. Ich bedanke mich für das große Vertrauen, das sie mir entgegengebracht haben, die differenzierte Kritik an den Versuchsergebnissen und die fantastische Unterstützung in allen Dingen, die über diese Arbeit hinausgingen.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für die herzliche Aufnahme ins Team, die großartige Unterstützung bei meiner Arbeit und die besondere Freundschaft, die mir entgegengebracht wurde.

