



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Charakterisierung autokriner Mechanismen in der Regulation des
Gallensalztransporters BSEP durch pro-inflammatorische
Mediatoren wie IL-1 β**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität

vorgelegt von

Leah Missing

aus Krefeld

Düsseldorf, Mai 2015

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Dieter Häussinger

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Johannes Bode

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2015

Veröffentlichung von Auszügen aus dieser Arbeit:

In Originalarbeiten

Bisher wurden hier noch keine Arbeiten veröffentlicht. Folgende Arbeiten sind derzeit in Vorbereitung und werden in absehbarer Zeit zur Veröffentlichung eingereicht:

Missing L., Knievel J., Wolf S., Hahnel M.J., Häussinger D., Bode J.G. *Inhibition of bile-acid induced expression of the bile salt export pump BSEP by IL-1 β involves chemokine driven autocrine circuits* [Manuskript in Bearbeitung]

Knievel J., **Missing L.**, Wolf S., Hahnel M.J., Böhmer O., Häussinger D., Bode J.G. *Combined stimulation with HGF and TNF α is required to enable chemokine-mediated recruitment of neutrophils by hepatocytes* [Manuskript in Bearbeitung]

Wolf S., Hahnel M.J., **Missing L.**, Knievel J., Albrecht U., Ehling C., Zanger U., Thomas M., Hengstler J.G., Häussinger D., Bode J.G. *Hepatocytes determine differentiation and activation of macrophages through intercellular communication* [Manuskript in Bearbeitung]

Posterbeiträge

Missing L., Häussinger D., Bode J. G. *Regulation of bile acids transporters through crosstalk of bile acids and cytokine induced signal transduction in hepatocytes*; Virtual Liver Retreat, November 2011, Hünfeld

Missing L.*, Wolf S*., Häussinger D., Bode J. G. *Reconstitution of macrophage population and impact of their differential activation on cytokine signaling and FXR-dependent bile acid transporter expression in hepatocytes during liver regeneration*; 4th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells (SBMC), Juli 2012, Leipzig (* gleichberechtigte Erstauthoren)

Missing L., Häussinger D., Bode J. G. *Inhibition of the transcriptional regulation of CDCA-induced BSEP expression by IL-1 β involves the IL-1 β triggered activation of autocrine chemokine circuits*; GASL, Januar 2015, München

„The problem with the world is that the intelligent people are full of doubts, while the stupid ones are full of confidence”

Charles Bukowski

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 5 -
Abbildungsverzeichnis	- 9 -
Tabellenverzeichnis	- 13 -
Abkürzungsverzeichnis	- 14 -
1 Einleitung	- 19 -
1.1 Die Leber	- 19 -
1.1.1 Anatomie und Funktion.....	- 19 -
1.1.2 Die Zelltypen der Leber	- 22 -
1.1.3 Die Produktion von Galle und der enterohepatische Kreislauf.....	- 24 -
1.2 Hepatobiliärer Transport	- 25 -
1.3 BSEP (ABCB11)	- 29 -
1.4 Die Cholestase im Kontext der Entzündung.....	- 31 -
1.5 Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α	- 33 -
1.6 Farnesoid X Rezeptor.....	- 35 -
1.7 Die cAMP-vermittelte Signalübertragung	- 38 -
1.8 Chemokine	- 41 -
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	- 43 -
2 Material und Methoden	- 44 -
2.1 Material.....	- 44 -
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	- 44 -
2.1.2 Medien, Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur.....	- 45 -
2.1.3 Spezielle Materialien und Geräte	- 46 -
2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen	- 47 -
2.1.5 Oligonukleotide (<i>Primer</i> RT-PCR).....	- 51 -
2.1.6 Antikörper (Western Blot)	- 51 -
2.1.7 Molekularbiologische Kits.....	- 52 -
	- 5 -

2.1.8	Verwendete Zelllinien und primäre Zellpräparationen.....	- 52 -
2.1.9	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	- 53 -
2.2	Methoden	- 54 -
2.2.1	Zellbiologische Methoden	- 54 -
2.2.1.1	Präparation muriner Hepatozyten.....	- 54 -
2.2.1.2	Aufreinigung primärer Hepatozyten	- 55 -
2.2.1.3	Die <i>monolayer</i> -Kultur primärer Hepatozyten	- 55 -
2.2.1.4	Die <i>sandwich</i> -Kultur primärer Hepatozyten	- 56 -
2.2.1.5	Präparation neutrophiler Granulozyten.....	- 56 -
2.2.1.6	Migration	- 57 -
2.2.1.7	Kultivierung der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG	- 58 -
2.2.1.8	RT ² Profiler PCR Array „Chemokine und Rezeptoren (Maus)“	- 59 -
2.2.1.9	cAMP XP Chemiluminescent Assay.....	- 59 -
2.2.1.10	Zytotoxizitäts-Assay	- 60 -
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	- 60 -
2.2.2.1	Präparation von Proteinlysaten aus ML-Kultur.....	- 60 -
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	- 60 -
2.2.2.3	Western Blot	- 61 -
2.2.2.4	ELISA	- 62 -
2.2.2.5	Proteom Profiler Array	- 62 -
2.2.3	RT-PCR	- 63 -
2.2.3.1	RNA Präparation.....	- 63 -
2.2.3.2	Reverse Transkription.....	- 63 -
2.2.3.3	Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion	- 64 -
2.2.4	Verwendete PC-Programme und Online-Tools	- 65 -
2.2.5	Statistische Auswertung.....	- 65 -

3	Ergebnisse	66 -
3.1	Einflussfaktoren der FXR-vermittelten BSEP Transkription	66 -
3.1.1	50 μ M CDCA wirken maximal auf die BSEP Transkription	66 -
3.1.2	CDCA-Stimulation über 8h führt zu maximaler BSEP Transkription	68 -
3.1.3	Die über CDCA induzierbare BSEP Genexpression ist abhängig von FXR. -	69 -
3.1.4	Dexamethason fördert die CDCA-induzierte BSEP Genexpression	70 -
3.1.5	Einfluss von pro-inflamm. Zytokinen auf die CDCA-verm. BSEP Expression-	71 -
3.1.6	IL1- β hemmt ab 0,05 ng/ml die CDCA-bedingte BSEP Genexpression	73 -
3.1.7	IL-1 β inhibiert bis zu 2h nach CDCA-Stimulation die BSEP Expression	76 -
3.1.8	IL1R1 vermittelt den IL-1 β -Effekt auf die CDCA-verm. BSEP Transkription ..	77 -
3.2	IL-1 β erhöht den intrazellulären cAMP-Spiegel.....	79 -
3.3	cAMP hemmt die CDCA-bedingte Aktivierung des BSEP Gens.....	81 -
3.4	Der Einfluss von IL-1 β auf die Chemokin-Expression	86 -
3.4.1	IL-1 β fördert das translationale Chemokin-Expressionsprofil	86 -
3.4.2	IL-1 β fördert das transkriptionelle Chemokin-Expressionsprofil	89 -
3.5	CXC-Chemokine hemmen die CDCA-bedingte BSEP Genexpression.....	93 -
3.6	Die CXCR2 Hemmung negiert den inhibitorischen Effekt von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP Genexpression	99 -
4	Diskussion	103 -
4.1	Die Einflussfaktoren der FXR-vermittelten BSEP Transkription	103 -
4.1.1	CDCA und Glukokortikoide fördern die BSEP Genexpression.....	103 -
4.1.2	IL-1 β übt schon in geringer Konzentration einen maximal hemmenden Effekt auf die CDCA-bedingte BSEP Expression aus	105 -
4.1.3	IL-1 β führt zum Anstieg von intrazellulärem cAMP, dessen Akkumulation die CDCA-bedingte BSEP Genexpression hemmt	107 -
4.2	IL-1 β induziert in PMHs präferentiell die Produktion von CXCR2-Liganden.....	109 -
4.3	CXC-Chemokine hemmen die CDCA-induzierte BSEP Expression über Aktivierung des Rezeptors CXCR2.....	110 -

4.4 Die Hemmung der CXCR2-Aktivierung hebt den inhibitorischen Effekt von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP Expression auf	- 111 -
5 Zusammenfassung	- 113 -
6 Summary	- 115 -
7 Anhang	- 116 -
Literaturverzeichnis	- 118 -
Danksagung	- 143 -
Lebenslauf	- 144 -
Eidesstattliche Erklärung	- 145 -

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Schemazeichnung der verschiedenen Zelltypen der Leber.....- 23 -
- Abbildung 2** Das Verteilungsmuster der Transportproteine im Hepatozyten- 28 -
- Abbildung 3** Die FXR-vermittelte transkriptionelle Regulation der Transportproteine....- 37 -
- Abbildung 4** Der Einfluss von Agenzien auf den intrazellulären cAMP-Spiegel- 40 -
- Abbildung 5** Einfluss von CDCA auf die Zellviabilität von PMHs und HepaRG Zellen- 66 -
- Abbildung 6** 50 µM CDCA-Stimulation maximiert die BSEP Expression in PMHs- 67 -
- Abbildung 7** CDCA-Stimulation über 8h hinaus führt zu keinem signifikanten Unterschied der maximalen BSEP Transkription in PMHs- 68 -
- Abbildung 8** Der Einfluss der CDCA-Stimulation auf die BSEP Transkription von wt und FXR deletierten PMHs- 69 -
- Abbildung 9** Dexamethason fördert die BSEP Transkript Akkumulation- 70 -
- Abbildung 10** TNF α hemmt die CDCA-induzierte BSEP Transkription bei PMHs in SC- 71 -
- Abbildung 11** Visueller Vergleich der Kultivierung von PMHs in ML und SC.- 72 -
- Abbildung 12** Der konzentrationsabhängige Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von PMHs und der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG- 74 -

Abbildung 13 Der konzentrationsabhängige Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von PMHs in SC - 75 -

Abbildung 14 Der Einfluss der zeitabhängigen Applikation von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription von PMHs in SC - 76 -

Abbildung 15 Der Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von IL1R1^{-/-} PMHs..... - 77 -

Abbildung 16 Der Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von FXR^{-/-} PMHs..... - 78 -

Abbildung 17 Der Einfluss von CDCA und IL-1 β auf den cAMP-Spiegel von PMHs..... - 79 -

Abbildung 18 IBMX hemmt die CDCA-vermittelte BSEP Transkription in PMHs - 81 -

Abbildung 19 Der konzentrationsabhängige Einfluss von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription in PMHs..... - 82 -

Abbildung 20 Einfluss der simultanen Applikation von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription von PMHs - 83 -

Abbildung 21 Forskolin hemmt die CDCA-vermittelte BSEP Transkription in PMHs in SC und ML-Kultur sowie in der Zelllinie HepaRG - 84 -

Abbildung 22 Der Einfluss von 8-M-IBMX auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression in PMHs..... - 85 -

Abbildung 23 Der Einfluss von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription in FXR^{-/-} PMHs..... - 85 -

Abbildung 24 Analyse der Chemokinexpression des Zellkulturüberstands von PMHs stimuliert mit IL-1 β - 87 -

Abbildung 25 Quantitative Erfassung des konzentrationsabhängigen Einflusses von IL-1 β auf die Sezernierung von CXCL 1, 2 und 5 von PMHs in den Zellkulturüberstand- 88 -

Abbildung 26 Der Einfluss von CDCA auf die Sezernierung von CXCL 1, 2 und 5 durch PMHs.....- 89 -

Abbildung 27 Der Einfluss von CXCL 1 und CXCL 2 auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression- 93 -

Abbildung 28 Inhibition der Chemokin-Wirkung auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription mittels CXCR2 Rezeptorhemmung- 94 -

Abbildung 29 Nachweis der Bioaktivität der CXCL 1 und 2 Proteinstandardslösungen - 95 -

Abbildung 30 Der Einfluss rekombinanter Chemokine auf die CDCA-induzierte BSEP Expression in PMHs- 96 -

Abbildung 31 Der Einfluss von mit IL1- β konditioniertem Kultivierungsmedium auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription von PMHs in SC- 97 -

Abbildung 32 Die Aufhebung des inhibitorischen Effekts des Überstandstransfers auf die CDCA-stimulierte BSEP Transkription PMHs in SC.....- 98 -

Abbildung 33 Der Einfluss der partiellen Aufhebung des IL-1 β -Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Hemmung des Rezeptors CXCR2.....- 99 -

Abbildung 34 Der Einfluss der partiellen Aufhebung des IL-1 β -Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Hemmung des Rezeptors CXCR 2.....- 100 -

Abbildung 35 Die partielle Aufhebung des IL-1 β -Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Hemmung des Rezeptors CXCR2 ist in FXR-defizienten Hepatozyten nicht induzierbar- 101 -

Abbildung 36 Der Einfluss der partiellen Aufhebung des IL-1 β -Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Inhibition des Rezeptors CXCR2 auf dem Level des intrazellulären cAMP-Spiegels von PMHs- 102 -

Abbildung 37 Zusammenfassung der durch IL- β ausgelösten Regulationsmechanismen zur Herabregulation des durch CDCA-induzierten BSEP Gens.- 112 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Makro- und mikroskopische Lebereigenschaften von Mensch und Maus.	21 -
Tabelle 2 Humane und murinen Mitglieder der CXC-Familie	42 -
Tabelle 3 Murine und humane Oligonukleotid-Primersequenzen.....	51 -
Tabelle 4 Primär- und Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse	51 -
Tabelle 5 Der positive Einfluss von IL-1 β auf das PMH Chemokin-Expressionsprofil	90 -
Tabelle 6 Der neutrale Einfluss von IL-1 β auf das PMH Chemokin-Expressionsprofil	91 -
Tabelle 7 Der negative Einfluss von IL-1 β auf das PMH Chemokin-Expressionsprofil	92 -
Tabelle 8 Der positive Einfluss von IL-1 β auf die CXC-Chemokine und CXCR2	92 -
Tabelle 9 Belegung der RT ² Messplatte des Chemokinarrays.....	116 -

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AC	<i>Adenylylzyklase</i>
Acc	<i>acceleration</i>
ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
APS	<i>Ammoniumperoxidsulfat</i>
ASCOM	<i>ASC-2/NCO A6 Komplex</i>
ATP	<i>Adenosintriophosphat</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BCRP	<i>Breast cancer related protein</i>
BDL	<i>bile duct ligation</i>
BGW	<i>Bindegewebe</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BRIC	<i>benigne rezurrenre intrahepatische Cholestase</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
CaCl ₂	<i>Kalziumchlorid</i>
cAMP	<i>zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat</i>
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
CDCA	<i>chenodesoxycholic acid</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	<i>zyklisches Guanosinmonophosphat</i>
CRE	<i>cAMP responsives Element</i>
CREB	<i>CREB-bindendes Protein</i>
Cu	<i>Kupfer</i>
CYP7A1	<i>Cytochrom P450 7a Hydroxylase</i>

Da	Dalton
Dec	<i>deceleration</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DILI	<i>drug induced liver injury</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1	<i>early growth response 1</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epithel-zu-Mesenchym-Transition
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FXR	<i>farnesoid X receptor</i>
FXREs	FXR responsive Elemente
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
Gusb	β-Glucuronidase
Hax1	HCLS-1-assoziiertes Protein
HCl	Salzsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HPRT1	Hypoxhantin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>hepatic stellate cells</i>

IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICP	intrahepatische Cholestase der Schwangerschaft
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IR	<i>inverted repeat</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal activated kinase</i>
KC	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LBP	LPS-bindendes Protein
Lrh1	Leber-Rezeptor-Homolog-1
LPS	Lipopolysaccharid
LXR α	<i>liver X receptor alpha</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein 2</i>
MK2	Mitogen aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase
ML	<i>monolayer</i>
MRP	<i>multidrug resistance associated protein</i>
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natrium-Vanadat
N-CoR	<i>nuclear receptor co-repressor</i>

Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
NTCP	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting protein</i>
O ₂	Sauerstoff
OATPs	<i>organic anion transporting polypeptides</i>
OATs	<i>organic anion transporters</i>
OCT	<i>organic cation transporters</i>
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDEs	Phosphodiesterasen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFIC	progressive familiäre intrahepatische Cholestase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMHs	primäre murine Hepatozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PXR	<i>pregnane X receptor</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
R	Rezeptor
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rF	relative Luftfeuchtigkeit
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
RT	Raumtemperatur
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SC	<i>sandwich culture</i>

SD	<i>standard deviation</i>
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
SHP	<i>short heterodimer partner</i>
SMRT	<i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>
SPF	spezifisch Pathogen-frei
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline with Tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLP	Triton-Lysepuffer
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
V.	<i>Vena</i>
Vv.	<i>Venae</i>
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen. Fremdsprachige Begriffe sind *kursiv* dargestellt.

1 Einleitung

1.1 Die Leber

1.1.1 Anatomie und Funktion

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan und die größte Drüse des Körpers (Schiebler *et al.* 1999). Bei einem Erwachsenen macht ihre Masse etwa 2% des Körpergewichts aus und sie wiegt zwischen 1,5 und 2 kg (Schiebler *et al.* 1999). Sie nimmt alle Stoffe auf, die ihr durch Resorption mit dem Blut aus dem Darm durch die *Vena portae* zugeleitet werden, verarbeitet oder speichert sie und gibt die Stoffwechselprodukte wieder in die Blutbahn ab. Dabei erfolgt auch eine Entgiftungsreaktion (Huppelsberg und Walter 2009). Zu den resorbierten Stoffen, die durch die Leber prozessiert werden, gehören Proteine, die zu Aminosäuren abgebaut werden, Ammoniak, aus dem Harnstoff und Glutamin synthetisiert werden und zugeleitete Kohlenhydrate, die zur Synthese von Glykogen verwendet werden (Klinische Pathophysiologie 2006). Die Leber spielt auch in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität eine wichtige Rolle und ist für die sogenannte Akute-Phase-Antwort von zentraler Bedeutung (Bode *et al.* 2012; Häussinger *et al.* 2004; Crispe 2009). Im frühen Stadium der Entwicklung ist die Leber an der Bildung von Erythrozyten beteiligt, so dass ihr Gewicht um den 6. Entwicklungsmonat etwa 10% des Körpergewichts beträgt (Moll 2006).

Eine wichtige Funktion der Leber ist der Fettsäurestoffwechsel¹. Zum effektiven Verdau von Nahrungsfetten durch Lipasen im Dünndarm bilden diese mit Hilfe von in der Leber gebildeten Gallensäuren als Emulgatoren sogenannte Mizellen. Gallensäuren werden als Antwort auf die Aufnahme der Nahrungsfette über ein spezielles Gangsystem in das Duodenum abgeleitet (Schiebler *et al.* 1999). Die in den Hepatozyten synthetisierte Galle fließt durch ein Netzwerk aus Gallenkanälchen und gelangt über dieses kommunizierende Gangsystem von der Leber in das Duodenum. Die kleinsten Einheiten sind die Gallenkanalikuli, die durch feine Membranausstülpungen der Hepatozyten entstehen. Die Galle gelangt nach der Passage der Kanalikuli in die an der Grenzfläche zwischen Portalfeld (an den Eckpunkten der Leberläppchen) und Läppchenparenchym gelegenen Duktuli. Die Duktuli werden von Cholangiozyten und Hepatozyten geformt.

Sie durchbrechen die Grenzlamelle, gelangen in die Portalfelder und vereinen sich zu interlobulären Gallengängen. Die interlobulären Gallengänge konfluieren Richtung Leberhilus zu septalen Gängen, welche sich wiederum zu segmentalen Gängen zusammenfügen. Schlussendlich bilden sie die im Durchmesser 1–1,5 mm großen, intrahepatischen hilären Gallengänge und verlassen vereint als *Ductus hepaticus communis* die Leber. Das Volumen des makroskopischen Gallengangsystems des Menschen beläuft sich auf 14–24 cm³ und seine innere Oberfläche auf 336–575 cm². Den Leberhilus verlassen die Lebervene und der extrahepatische Gallengang, über den die von der Leber synthetisierte Gallenflüssigkeit ins Duodenum abfließt. Bis zur nächsten Nahrungsaufnahme wird beim Menschen die Gallenflüssigkeit in der Gallenblase zwischengelagert und eingedickt. Sie liegt an der Unterseite der Leber und ist durch den Gallenblasengang mit dem Gallengang verbunden (Dancygier und Allescher 2003).

Die Leber liegt intraperitoneal und ist mit Ausnahme der *Area nuda*, der Verwachsungsstelle mit dem Diaphragma, vollständig vom Peritoneum umgeben. Sie wird über verschiedene Bänder mit dem Zwerchfell, der rechten Niere, der Bauchwand, dem Magen und dem Duodenum verbunden, sie dienen als Führungsbänder. So verläuft im *Ligamentum hepatoduodenale* der *Ductus choledochus*, die *A. hepatica propria* und die *V. portae*. In der Position wird die Leber durch den thorakalen Sog sowie die Nachbarorgane und die Bauchpresse gehalten (Schiebler *et al.* 1999).

Bei der Gliederung der Leber des Menschen muss zwischen einer makroskopischen Gliederung und einer Binnengliederung unterschieden werden. Makroskopisch unterscheidet man den *Lobus dexter* vom *Lobus sinister*, wobei der linke Leberlappen kleiner als der rechte ist. Die in der Mitte liegenden *Lobi quadratus* und *caudatus* gehören zum *Lobus dexter* (Sobotta *et al.* 2010). Die Binnengliederung orientiert sich jedoch an den Verzweigungen der Gefäße und lässt eine Gliederung der Leber in eine Ordnung von Segmenten zu. Die Leberlappen lassen sich allgemein weiter unterscheiden in die Untereinheit der polygonalen Leberläppchen, welche wiederum aus Leberzellbalken aufgebaut sind (Schiebler *et al.* 1999). Die Leber der Maus hingegen besteht aus vier Leberlappen ähnlicher Nomenklatur, sie werden aber alle als eigenständige *Lobi* kategorisiert, welche in ihrer Anatomie weiter unterteilt werden können (Fiebig *et al.* 2012). Die Leber der Maus wiegt etwa 2 g und macht damit 6% des Körpergewichts aus. Sie nimmt den ganzen *sub-diaphragmatischen* Bereich der Bauchhöhle ein, womit ihr eine prominentere Position zu Teil wird als beim Menschen (Treuting und Dintzis 2012). Weitere makro- und mikroskopische Unterschiede und

Gemeinsamkeiten zwischen der Leber von Mensch und Maus sind in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Makro- und mikroskopische Eigenschaften der Leber von Mensch und Maus. Abkürzungen: BGW = Bindegewebe (modifiziert nach Treuting und Dintzis 2012)

	Merkmal	Mensch	Maus
Gewebe	Leberzellbalken	manifest	gering manifest
	Glisson-Trias	alle Größen	keine kleinen Trias
	BGW in- und zwischen Trias	apparent bei Zirrhose	nicht apparent
	Struktur der Sinusoide	diskontinuierlich	diskontinuierlich
	Gallenkanalikuli	schwierige Detektion	schwierige Detektion
Zellen	Bi- und multinukleäre Hepatozyten	25 % Leberzellen	normal, vor allem mit zunehmendem Alter
	Zytoplasma <i>Clearing</i> (hydropische Degeneration)	selten	nach jeder Mahlzeit
	Kupffer-Zellen	15 – 25 % Leberzellen	oft
	Ito-Zellen	in Sinusoiden	in Sinusoiden

Die Blutversorgung der Leber wird auf Basis der Organversorgung und der Organfunktion bestimmt, so dass die Leber dementsprechend aus zwei Gefäßen Blut erhält. Die *Arteria hepatica propria* führt als nutritives (die Leber versorgendes Gefäß) O₂-reiches Blut zur Leber. Sie teilt sich in der Leberpforte in einen rechten und einen linken Ast. Die *Vena portae* führt als funktionelles Gefäß O₂-armes, aber dafür nährstoffreiches Blut aus dem Darm und der Milz zur Leber. Sie teilt sich ebenfalls in zwei Hauptäste. Innerhalb der Leber wird das Blut in den Leberläppchen über Sinusoide zu den Zentralvenen geleitet. Die ableitenden Vv. *hepaticae* münden dann schlussendlich in die *V. cava inferior* (Moll und Moll 2006).

1.1.2 Die Zelltypen der Leber

Die mikroskopische und funktionale Zusammensetzung der Leber basiert auf dem Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen, welche sich in Nichtparenchym- und Parenchymzellen grob unterteilen lassen. Die Parenchymzellen der Leber sind die Hepatozyten. Die Nichtparenchymzellen setzen sich mit ihrem jeweiligen prozentualen Anteil an der Gesamtheit der Leberzellen aus Sinusendothelzellen (10-20%), Kupffer-Zellen (15–25%) sowie Ito- und Pitt-Zellen (<5%) zusammen. Sie machen zwar nur 6% des Läppchenparenchymvolumens aus, aber 35% der Gesamtzellzahl, was ihren funktionalen Wert für die normale Aufrechterhaltung der Leberfunktion widerspiegelt (Dancygier 2010). Die Sinusendothel-, Kupffer- und Pit-Zellen stehen in direktem Kontakt mit dem sinusoidalen Blut. Die perisinusoidal gelegenen Ito-Zellen und die Hepatozyten kommen hingegen vorwiegend mit dem Blutplasma des Disse-Raumes in Kontakt. Sinusendothelzellen besitzen keine Basalmembran und bilden nur ein lockeres Zellgeflecht. Dies ermöglicht die direkte Kommunikation zwischen Sinusoidallumen und Disse-Raum. Sinusendothelzellen haben eine Klär- und Transportfunktion. Außerdem bilden und sekretieren sie Zytokine. Der Disse-Raum ist ein 0,2–0,5 µm breiter Bereich zwischen dem Sinusendothel und der sinusoidalen Oberfläche der Hepatozyten. Das Sinusendothel stellt eine selektive und bidirektionale Partikelbarriere zwischen Blutstrom und Hepatozyt dar. Neben den Sinusendothelzellen befinden sich intrasinusoidal leberspezifische Makrophagen, die Kupffer-Zellen. Sie machen 80–90% aller Gewebemakrophagen des Organismus aus und haften mittels Pseudopodien am Sinusendothel. Zu ihren Aufgaben gehört die Prozessierung und Präsentation von antigenem Material. Sie sezernieren Zytokine und beeinflussen parakrin die Funktion der anderen residenten Leberzelltypen. Ito-Zellen oder auch *hepatic stellate cells* (HSC) genannt, befinden sich im Disse-Raum zwischen der basolateralen Membran der Hepatozyten und der lumenabgewandten Seite der Sinusendothelzellen. Sie umgreifen mit ihren Fortsätzen die Sinusoide. Sie sind unter anderem am Vitamin-A Stoffwechsel sowie am Auf- und Abbau der Kollagen-, Elastin- und Glykosaminoglykan-reichen extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt. Diese befindet sich zwischen den verschiedenen Zelltypen und steht mit ihnen in einem bidirektionalen Kontakt. Die seltensten Nichtparenchymzellen sind die leberassoziierten Lymphozyten, die Pit-Zellen. Sie haften intrasinusoidal an der luminalen Seite der Endothelzellen (Abbildung 1) (Dancygier 2010; Dancygier und Allescher 2003).

Hepatozyten bilden in ihrer zellulären Gesamtheit das eigentliche Funktionsgewebe der Leber. Auf sie entfallen 80% des Parenchymvolumens und 60–70% des Anteils der Zellzahlen der in der Leber vorkommenden Zellen. Hepatozyten sind aufgrund ihrer enormen Stoffwechselleistung reich an Zellorganellen. Es sind 20–40 µm große, epitheliale und polygonal geformte Zellen. Die hepatozelluläre Plasmamembran lässt aufgrund funktioneller und auch morphologischer Unterschiede eine Aufteilung von drei spezialisierten Domänen zu. Dies lässt eine Polarisierung der Hepatozyten entstehen. Die Domänen unterscheiden sich im Vorkommen der Enzym- und Rezeptorausstattung, Transportsysteme und der biochemischen Fluidität. Man unterscheidet die sinusoidale (*basolaterale*), interzelluläre (*laterale*) und kanalikuläre (*apikale*) Domäne. 83% der Gesamtoberfläche entfallen beim Menschen auf die *laterale* und *basolaterale* Membran. Das Charakteristikum der basolateralen Membran sind die zahlreich vorkommenden und in den Disse-Raum ragenden Mikrovilli. Die *laterale* Membran reicht vom Gallenkanalikulus bis zum Rand der sinusoidalen Oberfläche. Sie stellt die Kontaktfläche zwischen benachbarten Hepatozyten dar und dient der interzellulären Kommunikation zwischen den Leberzellen. Am *apikalen* oder auch *biliären* Pol des Hepatozyten befindet sich die kanalikuläre Membran. Sie macht etwa 15% der Oberfläche aus. Durch Einstülpungen der Zellmembran von 2-3 aneinandergrenzenden Hepatozyten entsteht dort der Gallenkanalikulus (Dancygier 2010).

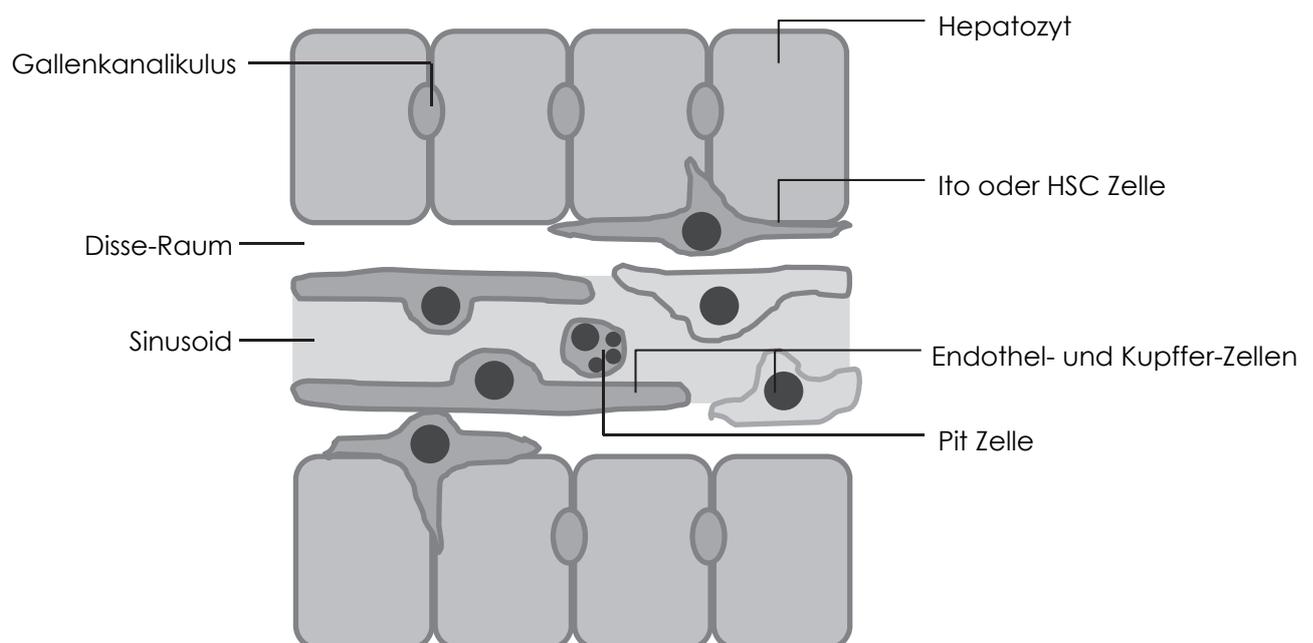


Abbildung 1 Schemazeichnung der verschiedenen Zelltypen der Leber. Erläuterungen siehe Text

1.1.3 Die Produktion von Galle und der enterohepatische Kreislauf

Die Ausscheidung lipophiler Substanzen über die Leber erfordert die Konjugation der selbigen mit reaktiven Gruppen und hydrophilen Komponenten wie z.B. Glucuronsäure, Acetat oder Gluthation (Klinische Pathophysiologie 2006). Die auf diese Weise nun wasserlöslichen Substanzen können über die Galle ausgeschieden werden. Die Gallenflüssigkeit enthält neben Gallensäuren wie z.B. Chenodeoxycholsäure (CDCA) auch Cholesterin, Lecithin, Steroide und Bilirubin sowie körperfremde Substanzen und Abbaustoffe wie Medikamente und Toxine, die zur Entgiftung des Körpers über die Leber ausgeschieden werden sollen (Elferink und Groen 2002). Zur Fettverdauung werden Gallensäuren in der Leber aus Cholesterin gebildet und mit Glycin oder Taurin konjugiert. Somit werden sie amphiphil und erhalten eine Detergenz-Wirkung. Sie emulgieren Nahrungsfette und bilden gemischte Mizellen, dies erhöht die Zugänglichkeit für den enzymatischen Verdau und die Adsorption an der Darmwand und ist für die Aufrechterhaltung der Cholesterin-Homöostase verantwortlich ist (Russell 1999). In den Leberzellen werden pro Tag etwa 600–700 ml Galle kontinuierlich gebildet. Sie gelangt über die Gallengänge in die Gallenblase, wo sie auf $\frac{1}{10}$ ihres Volumens eingedickt und gespeichert wird. Tritt fetthaltiger Chymus aus dem Magen ins Duodenum über, so kontrahiert sich die Gallenblase und setzt Gallenflüssigkeit frei, die über den *Ductus choledochus* ins Duodenum gelangt (Tortora *et al.* 2006). Nach erfolgreicher Fettverdauung werden die Gallensäuren „recycelt“. Über 90% der Gallensäuren werden rückresorbiert und gelangen über die *V. portae* zurück in die Leber. Dort werden sie von den Hepatozyten wieder aufgenommen, erneut über Transportproteine in die Gallenkanalikuli abgegeben und stehen für einen erneuten Einsatz für die Fettverdauung zur Verfügung. Dieser enterohepatische Kreislauf wird, in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme, 4 bis 12-mal pro Tag durchlaufen (Russell 1999). Die zur Leber zurückgelangten Gallensäuren sind der stärkste Stimulus für die Gallesekretion. Die Synthese von 200–600 mg Gallensäuren aus Cholesterin ersetzt den Anteil, der täglich mit dem Stuhl ausgeschieden werden (Huppelsberg *et al.* 2009). Die Aufrechterhaltung dieses Kreislaufs wird auf molekularer Basis durch das funktionale Zusammenspiel der hepatozellulären Gallensäuretransporter, Cholangiozyten und Zellen des Intestinaltrakts ermöglicht (Klinische Pathophysiologie 2006; Kok *et al.* 2003).

1.2 Hepatobiliärer Transport

Der osmotische Prozess der Gallebildung wird durch Transportproteine in der Hepatozytenmembran ermöglicht (Abbildung 2). Das funktionelle Verteilungsmuster entspricht auf Basis der Zellpolarität einer Aufteilung in sinusoidale bzw. *basolaterale* und kanalikuläre bzw. *apikale* Transportproteine. Diese lokale und funktionelle Asymmetrie ist verantwortlich für den vektoriellen Transport von aus dem Blut stammenden Soluten durch die Hepatozyten und die schlussendliche Abgabe der intrazellulär gebildeten Galle an die Gallenkanalikuli (Oude *et al.* 2006; Muller 2000; Kullak-Ublick *et al.* 2000b; Häussinger *et al.* 2000).

Die Proteinfamilien der sinusoidal exprimierten Transportproteine sind zumeist für die Aufnahme von endogenen und xenobiotischen Substanzen aus dem Portalvenenblut zuständig (Meier und Stieger 2002). Das *Na⁺-taurocholate cotransporting protein* (NTCP) ermöglicht die Na^+ -abhängige Aufnahme von Gallensäuren in einem Verhältnis von 2:1, transportiert diese vornehmlich konjugiert als Gallensalze und ist das entscheidendste System des Hepatozyten für die Aufnahme von Gallensalzen (Weinman *et al.* 1998; Stieger 2011; Mita *et al.* 2005; Sidler *et al.* 2004; Häussinger *et al.* 2004). Dabei wird NTCP auf Basis seiner Funktion nur von Leberparenchymzellen exprimiert (Meier 1995; Sun *et al.* 2001a). Für den Na^+ -unabhängigen Transport von konjugierten und nicht-konjugierten Gallensäuren, nicht-konjugiertem Bilirubin und amphiphatischen Verbindungen wie Steroiden, Schilddrüsenhormonen und auch vieler Xenobiotika sind in unterschiedlichem Maße die Mitglieder der großen Familie der *organic anion transporting polypeptides* (OATPs) verantwortlich (Meier *et al.* 1997; Meng *et al.* 2002; Häussinger *et al.* 2004). Die menschliche Leber exprimiert OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 und OATP1A2. Dabei spielt OATP1B1 die entscheidendste Rolle von allen OATPs bei der Aufnahme von Gallensäuren (Zair *et al.* 2008). Weitere Vertreter für die Aufnahme von Substraten durch den Transport durch die sinusoidale Membran sind zum einen die *organic anion transporters* (OATs) und zum anderen die *organic cation transporters* (OCTs), welche für den Transport von organischen Kationen verantwortlich sind (Alrefai und Gill 2007; Sun *et al.* 2001b; Nies *et al.* 2009). Die *basolaterale* Membran von Hepatozyten exprimiert in einem schwachen Muster auch Mitglieder einer *ATP-binding cassette* (ABC) Transporterfamilie, die für den Export von Substraten verantwortlich sind. Zu ihnen gehört der *multidrug resistance associated protein* Transporter 3 (MRP3), welcher von Cholangiozyten, Gallenblasen-Epithel und auch in extra-hepatischen Organen wie

Darm, und Niere exprimiert wird (Kool *et al.* 1999; Soroka *et al.* 2001; Rost *et al.* 2002; Häussinger *et al.* 2004). MRP3 zeigt die gleiche Substratspezifität auf wie der zur gleichen Familie gehörende, sich aber *apikal* in der kanalikulären Membran befindende, MRP2 Transporter (Zelcer *et al.* 2003b). Sie exportieren vornehmlich konjugiertes Bilirubin und sulfatierte oder monovalente Gallensalze. Weitere Mitglieder sind die Export-Pumpe MRP4 (Zelcer *et al.* 2003a; Reid *et al.* 2003), die im Ko-Transport reduziertes Gluthation und Gallensalze ausschleust, MRP5, welches zyklische Nukleotide nach außen pumpt und MRP6, welches ebenfalls mit Gluthation-konjugierte Substrate transportiert (Alrefai und Gill 2007).

Die kanalikuläre, oder auch *apikale* Membran polarer Hepatozyten enthält viele Transportproteine, die zur Familie der ATP-bindenden ABC-Transporter gehören. Hierbei handelt es sich um Transporter, die für den Transport von Substraten gegen den Konzentrationsgradienten die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzen. Zu diesen gehört der *multidrug resistance protein 1* (MDR1) Transporter, der zur P-Glykoprotein Familie gehört (Choi und Yu 2014; Yoo und Lee 2011). MDR1 transportiert Kationen und Xenobiotika und eliminiert weiterhin auch endogene Substanzen wie Steroidhormone durch die Zuführung in die Gallenflüssigkeit (Cole *et al.* 2014). Ein weiteres Mitglied der ABC-Transporter ist MDR3, dessen Aufgabe als Phospholipid- und Phosphatidylcholin-Carrier durch *Knockout*-Versuche mit dem murinen Homolog Mdr2 aufgedeckt werden konnte (Borst *et al.* 1993; Häussinger *et al.* 2004). Ein für den Transport und die Exkretion von Gallensalzen unverzichtbares Mitglied der P-Glykoprotein Familie ist der ABC-Transporter *bile salt export pump* (BSEP/ABCB11, ehemals *sister of P-glycoprotein/Spgp*) (Kullak-Ublick *et al.* 2000a; Thompson und Strautnieks 2001; Muller und Jansen 1997). Transportiert werden vornehmlich konjugierte Gallensalze, aber auch verschiedene nicht-konjugierte Gallensäuren werden über diesen Weg ausgeschleust. Als hauptverantwortliches Transportprotein kann BSEP durch die Steuerung der Ausschleusungsrate von Gallensalzen eine sehr hohe Konzentration, bis zu 1000-fach höher als im Blut der Portalvene, erzeugen und ist somit der hauptverantwortliche Mediator der Gallensalz-abhängigen Regulation des Galleflusses (Kullak-Ublick *et al.* 2004; Kubitz *et al.* 2012). Das MRP2 Transportprotein, welches zuvor bereits erwähnt wurde, weist keine besondere Substratspezifität auf und transportiert im Grunde das gesamte Spektrum an bereits erwähnten Substraten der ABC-Transporter der *apikalen* Membran (Le Vee *et al.* 2009; Moreau *et al.* 2011; Meier und Stieger 2002). Weitere Transportproteine sind das FIC1 Genprodukt, dessen Mutation zu einer schweren

Cholestase führt (Morotti *et al.* 2011), *Breast cancer related protein* (BCRP), welches für die Eliminierung von Xenobiotika und den Transport von Estron sorgt (Noguchi *et al.* 2014) sowie die beiden, als Heterodimere funktionell voneinander abhängigen ABCG5 und ABCG8 Transporter, die für die *biliäre* Cholesterinsekretion verantwortlich sind (Kusuhara und Sugiyama 2007).

Die krankhafte Beeinträchtigung des hepatobiliären Transports führt zumeist zur Entstehung einer Cholestase, welche als wichtiges klinisches Leitsymptom akuter und chronischer Lebererkrankungen anzusehen ist. Sie entsteht durch die Retention der Substanzen, die normalerweise durch die Leber in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden (Klinische Pathophysiologie 2006).

Die allgemeine Regulation des hepatobiliären Transports kann unterteilt werden in Kurzzeit- und Langzeit-Regulationsmechanismen (Häussinger *et al.* 2004; Häussinger *et al.* 2000). Die Langzeitregulation wird auf dem Level der Transkription der beteiligten Zielgene vollzogen und beinhaltet die Interaktion mit komplexen intrazellulären Signalnetzwerken, welche durch Zytokine, Hormone, Metabolite und Substrate kontrolliert werden und über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Expressionsstärke von Zielgenen nehmen (Häussinger *et al.* 2000). Die mannigfaltigen Mechanismen der Kurzzeitregulation des hepatobiliären Transports beinhalten posttranslationale Modifikationen der Transportproteine, Mechanismen zur Steuerung des Stimulus-abhängigen Ein- und Ausbaus der Transportproteine aus der Membran und die Beeinflussung der Substratverfügbarkeit. Diese Prozesse unterliegen der Kontrolle multipler intrazellulärer Signalwege, die auf der Grundlage verschiedener Weiterleitungsmechanismen interagieren (Häussinger *et al.* 2004; Häussinger *et al.* 2000; Kubitz *et al.* 2004; Kubitz *et al.* 2012).

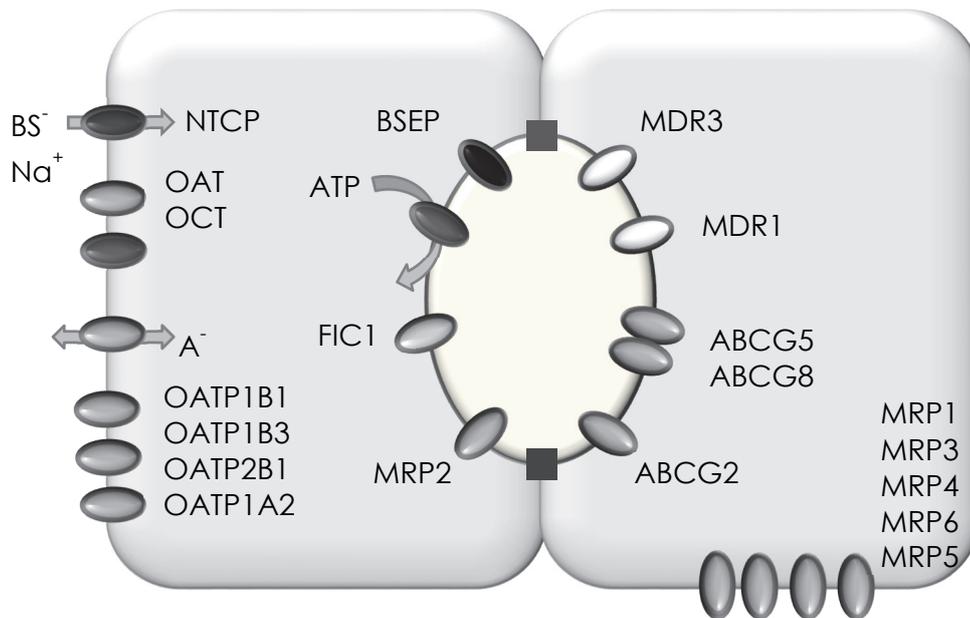


Abbildung 2 Das Verteilungsmuster der Transportproteine in den Membrandomänen der polarisierten Hepatozyten. Ausführliche Erläuterungen sind im Text beschrieben (modifiziert nach Häussinger *et al.* 2004)

1.3 BSEP (ABCB11)

Das für den hoch konzentrierten, und gegen den Konzentrationsgradienten gerichteten, aktiven Transport von Gallensalzen aus der apikalen Membran polarisierter Hepatozyten in die Gallenkanalikuli bedeutendste Transportprotein, ist BSEP (ABCB11) (Stieger 2011; Thompson und Strautnieks 2001). Das Translationsprodukt besteht aus 1.321 Aminosäuren und die molekulare Masse beläuft sich auf ungefähr 160 kDa (Kubitz *et al.* 2012). Auf molekularer Ebene besteht der Transporter aus 12 transmembranen *Helices* und zwei großen Nukleotid-Bindungsdomänen (Kubitz *et al.* 2012; Strautnieks *et al.* 1997; Thompson und Strautnieks 2001). BSEP wird nur in Hepatozyten exprimiert und dies vornehmlich in hohem Maße in der kanalikulären Membran (Kipp und Arias 2000). Als „*lith gene*“ wurde BSEP als ein Gen identifiziert, welches mit einer höheren Anfälligkeit für die Bildung von Gallensteinen assoziiert ist (Lammert *et al.* 1999; van Erpecum *et al.* 2001). BSEP ist verantwortlich für den Gallensalz-abhängigen Gallefluss (Kubitz *et al.* 2012). Experimentelle Vergleichsstudien zeigten, dass die Transportrate für toxische Gallensäuren wie CDCA und ihre Derivate bedeutend effektiver ist als die Transportrate für die weniger toxischen Derivate der Cholsäure (Song *et al.* 2011). Die Prozessierung und der intrazelluläre Transport von neu synthetisiertem BSEP zu seinem Bestimmungsort wird durch Stimulierung der Proteinkinase C und der p38 MAP-Kinase veranlasst (Kubitz *et al.* 2004). Diese wiederum sind ebenso an der Gallensäuren-induzierten Exozytose Transporter-tragender Vesikel beteiligt (Kurz *et al.* 2001). Dementsprechend ist die signalisierende Kraft des intrazellulären Proteintransports die gleiche, nur die Richtung ist Stimulus-abhängig. Die Stimulus-abhängige Internalisierung von BSEP aus der Membran wird durch das HCLS1-assoziierte Protein X-1 (Hax1) reguliert. Dessen Deletion führt zu einer Überexpression von BSEP in der *apikalen* Membran (Kubitz *et al.* 2012). Des Weiteren ist Cortactin, ein Interaktionspartner von Hax-1, an der Internalisierung beteiligt (Ortiz *et al.* 2004; Kubitz *et al.* 2012). Die Langzeitregulation von BSEP ist sehr komplex und wird zumeist auf dem Level der Transkription vollzogen. Die hauptsächlich verantwortlichen Regulatoren der BSEP Expression sind der Farnesoid X Rezeptor (FXR), das Leber Rezeptor Homolog 1 (Lrh1) und der nukleäre Faktor *erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) (Kubitz *et al.* 2012). Lrh1 ist ein Schlüsselregulator des Enzyms CYP7A1, welches das maßgebliche Enzym für die Gallensäurensynthese aus Cholesterin ist. Eine Hepatozyten-spezifische Deletion zeigte eine Verminderung der BSEP Transkription (Song *et al.* 2008). Nrf2 ist ebenfalls ein positiver Regulator von BSEP (Weerachayaphorn *et al.*

2009). Es ist ein Sensor für oxidativen Stress und Regulator der möglichen Gegenmaßnahmen gegen die durch toxische Gallensäuren entstehenden reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) (Klaassen und Reisman 2010). Der FXR Rezeptor transaktiviert zusammen mit seinem obligaten Partner *retinoid X receptor alpha* (RXRa) direkt den BSEP Promotor nach Aktivierung durch Bindung von Gallensäuren (Gerloff *et al.* 2002; Plass, Jacqueline *et al.* 2002). In FXR-defizienten Mäusen ist die basale Expression von BSEP vermindert und die transkriptionelle Induzierbarkeit der BSEP Expression nach Fütterung der Mäuse mit Gallensäuren-haltigem Futter fast gänzlich aufgehoben (Sinal *et al.* 2000b). Die human prädominante Gallensäure CDCA ist der potenteste Agonist für FXR (Liu *et al.* 2014; Lew *et al.* 2004). Sie ermöglicht die Rekrutierung des ASCOM Komplexes. Dies ist ein aus verschiedenen Untereinheiten bestehender Ko-Aktivator-Komplex aus nukleären Rezeptoren, Ko-Aktivatoren und Methyltransferasen und ermöglicht die darauffolgende Methylierung der Histone in der BSEP Promotor-Region. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die FXR-abhängige BSEP Expression (Ananthanarayanan *et al.* 2011). Die Kurzzeitregulation von BSEP ermöglicht eine sehr rasche Adaption der Aktivität durch Vesikelbildung und den Transport in oder aus der kanalikulären Membran innerhalb von Minuten (Häussinger *et al.* 2004; Kubitz *et al.* 2012). Dies hat einen bedeutenden Einfluss auf die Kurzzeitregulation der Gallebildung. Dafür verantwortlich sind Änderungen in der hepatozellulären Hydratation, Hormone, Gallensäuren oder oxidativer Stress (Häussinger *et al.* 2000). Obwohl BSEP fast ausschließlich Gallensalze transportiert, können endo- sowie exogene Substanzen als Inhibitoren wirken. Es besteht dementsprechend eine Korrelation zu der cholestatischen, Drogen-induzierten Leberschädigung (DILI) (Kubitz *et al.* 2012). Monogenetische Lebererkrankungen sind ebenfalls Verursacher für die nicht ordnungsgemäße Funktion von BSEP und anderen kanalikulären Transportern und verursachen cholestatische Zustände die zu Krebs führen können (Kubitz *et al.* 2012). Dazu gehören u.a. die progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC), die mildere Form der benignen rekurrenten intrahepatischen Cholestase (BRIC) und die intrahepatische Cholestase der Schwangerschaft (ICP) (Strubbe *et al.* 2012; Stindt *et al.* 2013; Kremer *et al.* 2014).

1.4 Die Cholestase im Kontext der Entzündung

Eine Cholestase bezeichnet allgemein eine Störung der Gallebildung und des Galleflusses. Klinische Kennzeichen sind ein Anstieg gallenpflichtiger Substanzen im Blut und oftmals die Entstehung eines Ikterus (Gelbsucht). Die Gruppe der cholestatischen Lebererkrankungen muss weiter in extra- und intrahepatische Ursachen sowie einer obstruktiven oder nicht obstruktiven (akut/chronisch) Genese unterschieden werden. Eine extrahepatische Cholestase wird durch den mechanischen Verschluss des drainierenden Gallengangsystems verursacht (Klinische Pathophysiologie 2006). Dieser Zustand lässt sich experimentell am Tiermodell mit Hilfe der Gallengangligation (BDL) nachstellen. Die Ursache der meisten intrahepatischen Cholestasen ist nicht durch eine mechanische Abflussbehinderung in den Gallenwegen bedingt, sondern durch eine Anstauung in den Hepatozyten selbst aufgrund einer Störung des Transportsystems. Eine häufige Ursache für die Entstehung einer intrahepatischen Cholestase stellt die Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Rahmen intra- und extrahepatischer bakterieller Infektionen dar. Dieser Zusammenhang wird schon seit einiger Zeit untersucht (Utili *et al.* 1976; Whiting *et al.* 1995; Green *et al.* 1994; Green *et al.* 1996). Die Kennzeichen einer durch Sepsis-induzierten hepatozellulären Dysfunktion lassen sich ebenso durch die isolierte Stimulation mit Endotoxin oder Entzündungsmediatoren hervorrufen, ohne dass eine direkte bakterielle Infiltration notwendig ist (Wang und Chaudry 1996; Nolan *et al.* 1989; Lickteig *et al.* 2007). Die Entstehung einer Cholestase im Rahmen einer Entzündung wird meist durch Lipopolysaccharid (LPS) beziehungsweise Endotoxinfreisetzung Gram-negativer Bakterien ausgelöst, welches nach der Zirkulation im Körperkreislauf die Leber zwecks Entgiftung passiert. Als Reaktion auf diesen Toxinreiz werden vor allem von den hepatischen Kupffer-Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) in hohem Maße gebildet und sekretiert (Kosters und Karpen 2010; Whiting *et al.* 1995; Hong *et al.* 2010; Luster *et al.* 1994; Sewnath *et al.* 2002). Diese lokal gebildeten Zytokine führen dann wiederum zu einer Änderung der Transporterexpression und Funktion der Hepatozyten (Geier *et al.* 2006). Die verminderte Expression des hepatozellulären Transportsystems, das für die Aufnahme und Exkretion von Gallensäuren verantwortlich ist, führt zu einer Akkumulation von Gallensäuren in der Leber und im Serum (Trauner *et al.* 2005). Diesem Prozess liegen vor allem die verminderte transkriptionelle Induzierbarkeit der Transporter und der Ausbau der Proteine aus den spezialisierten Membrandomänen zugrunde. Besonders betroffen durch die Wirkung der pro-

inflammatorischen Zytokine sind BSEP, NTCP und MRP2 (Trauner *et al.* 1997; Vos *et al.* 1998; Hartmann *et al.* 2001; Trauner *et al.* 1998).

Eine Sepsis-assoziierte Cholestase lässt sich am Tiermodell nachvollziehen durch die Injektion von bakteriellem Lipopolysaccharid. Gelangt das LPS ins Blut, bindet es mit einer Untereinheit das LPS-bindende Protein (LBP) (Wilde *et al.* 1994). LBP ist ein von Hepatozyten synthetisiertes Akut-Phase-Protein. Dieser Komplex ist dann in der Lage, den *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) sowie an den Membran-assoziierten Rezeptor CD14 auf Monozyten und Makrophagen zu binden und induziert über den NF- κ B Signalweg die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β (Soares *et al.* 2010; Park und Wright 1996). Zytokine sind zu einem großen Teil mitverantwortlich für die Induktion einer Cholestase. Die Injektion von bakteriellem LPS im Mausmodell induziert dabei vornehmlich eine verminderte Expression von NTCP, MRP2 und BSEP (Elferink, Marieke *et al.* 2004; Hartmann *et al.* 2002). Der hemmende Effekt von IL-1 β und TNF α auf die Transporterexpression lässt sich im Tiermodell partiell aufheben durch die Gabe der entsprechenden Rezeptorantagonisten Anakinra (IL-1 β) und Etanercept (TNF α) (Geier *et al.* 2003).

1.5 Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α

Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α regulieren im Rahmen von Entzündungs-assoziierten Lebererkrankungen auch die Expression der Transportproteine der Leberzellen (Hartmann *et al.* 2002; Elferink, Marieke *et al.* 2004; Diao *et al.* 2010). Dies wurde im Rahmen von Untersuchungen zur obstruktiven Cholestase ebenfalls bestätigt (Donner *et al.* 2007).

IL-1 β wird in der Leber vor allem von Kupffer-Zellen gebildet als Reaktion auf Inflammasreize wie die Endotoxinfreisetzung (Ramadori und Armbrust 2001). Somit ist es ein hoch wirksamer Entzündungsmediator. Als inaktives Vorläuferprotein gebildet, wird es durch proteolytische Spaltung Caspase-1 abhängig aktiviert (Black *et al.* 1988). IL-1 β vermag nach Sekretion und Aktivierung durch einen sich selbst regulierenden Mechanismus die Transkription seines Vorläuferproteins zu steigern. Dementsprechend sorgt diese Amplifikationsschleife für das Ausreichen geringer IL-1 β Konzentrationen zum Auslösen eines biologischen Effekts (Dinarello 2013). IL-1 β aktiviert unter anderem den NF- κ B Signalweg (Renard *et al.* 1997) und wirkt über den Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (IL1R1) (Dinarello 2013). Seine Aktivierung kann aber durch den Rezeptorantagonisten IL1Ra aufgehoben werden. Die Aktivität der IL-1 β -vermittelten Entzündungsprozesse lassen sich durch den Einsatz synthetischer Agenzien vermindern. Zum einen durch die Applikation von gegen IL-1 β gerichtete Antikörper (Canakinumab) oder der Injektion eines Antagonisten gegen den IL1-Rezeptor (Anakinra) (Abbate *et al.* 2014).

TNF α ist ebenfalls ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches eine zentrale Rolle bei entzündlichen und immunologischen Reaktionen des Körpers spielt und eine fördernde Mediatorrolle bei durch Fremdreize ausgelösten, lokalen Entzündungen einnimmt (Bradley 2008). In der Leber wird es vornehmlich von Kupffer-Zellen ausgeschüttet. Es fördert die Synthese anderer Zytokine und über die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 wird unter anderem der NF- κ B Signalweg aktiviert (Aggarwal *et al.* 2012; Popa *et al.* 2007). Medikamente zur Blockierung der TNF α -abhängigen Reaktionen spielen zunehmend eine Rolle in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen. Anwendung finden hier synthetische Antikörper wie Adalimumab oder das synthetische Fusionsprotein Etanercept. Sie dämpfen die Entzündungsreaktionen, können aber zum Auftreten opportunistischer Infektionen führen (Moreland *et al.* 1999; Hanauer *et al.* 2006).

Pro-inflammatorische Zytokine aktivieren pleiotrophe Signalweiterleitungsmechanismen für die Propagation der Entzündungsantwort. Dabei mediierten die Mitglieder der Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase Familie eine große Bandbreite zellulären Verhaltens als Antwort auf extrazelluläre Stimuli (Pearson *et al.* 2001). MAP-Kinasen sind Mitglieder diskreter Signalkaskaden. Dabei werden distinkte Untergruppen innerhalb der MAP-Kinase Familie beschrieben: Extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen (ERKs), c-jun N-terminal aktivierte Kinasen (JNK) oder auch die p38 Gruppe der Proteinkinasen. MAP-Kinasen selbst sind Proteinkinasen. Sie phosphorylieren Proteine spezifisch an bestimmten Serin- bzw. Threonin-Resten (Seeger *et al.* 1995). Zu ihnen gehört auch die MK2, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Stabilität und Expression von TNF α einnimmt (Hitti *et al.* 2006; Ehling *et al.* 2007). Nach Phosphorylierung und nukleärer Akkumulation aktivieren MAP-Kinasen kerneigene Transkriptionsfaktoren zur Regulation ihrer vielfältigen Zielgene, unter anderem auch wiederum die Expressionsregulation von TNF α und IL-1 β (Fyhrquist *et al.* 2010).

1.6 Farnesoid X Rezeptor

Der Farnesoid X Rezeptor (FXR; NR1H4) gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren der Klasse II, dessen Gen auf Chromosom 12q23.1 zu finden ist und aus 11 Exons besteht. Analysen des FXR Locus zeigten weiterhin zwei alternative Promotoren und eine interne *splicing site*, so dass vier Isoformen bekannt sind (Huber *et al.* 2002). Dabei zeigt sich, dass die meisten FXR Zielgene auf eine Liganden-abhängige Aktivierung in einer Isoform-unabhängigen Weise ansprechen. FXR wird hauptsächlich in der Leber und im distalen Dünndarm exprimiert (Caudel *et al.* 2005). Weiterhin findet sich auch eine gewisse Expressionsrate in Niere, Herz und Nebenniere. Analysen mit FXR-defizienten Mäusen zeigten eine wichtige Schlüsselrolle von FXR für die Synthese, Sekretion und Detoxifikation der Gallenflüssigkeit (Schuetz *et al.* 2001b; Zollner *et al.* 2003; Kok *et al.* 2003; Sinal *et al.* 2000a). Weiteren Einfluss nimmt FXR auf den Lipoproteinmetabolismus, den Glukosemetabolismus und die Leberregeneration. Erhöhte Konzentrationen an Gallensäuren und Cholesterin führen zu metabolischen Krankheiten wie kardiovaskuläre Erkrankungen, die Bildung von Gallensteinen oder einer Cholestase und Krebs (Fiorucci *et al.* 2007; Caudel *et al.* 2005). Deswegen muss die Balance durch *feedback* Mechanismen streng reguliert werden. Ein Schlüsselmechanismus ist die Hemmung der Transkription von Cytochrom P450 7a Hydroxylase (CYP7A1) bei einem erhöhten Gallensäurespiegel (Chiang *et al.* 2000). Somit wird die Konversion von Cholesterin zu Gallensäuren verhindert. Diese *feedback* Hemmung fußt auf einem komplizierten Prozess, der aus einer Kaskade Gallensäuren-aktivierter Signalwege über die Vermittlung von FXR hinaus besteht. Dabei ist FXR nicht der einzige nukleäre Rezeptor, der die Leber vor der Toxizität eines Galleüberschusses schützt. Der *Pregnane X receptor* (PXR), *constitutive androstane receptor* (CAR) oder *Liver X receptor alpha* (LXRα) sind beispielsweise ebenso involviert (Staudinger *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2004; Song *et al.* 2000). Diese Redundanz an nukleären Rezeptoren in einem Netzwerk zur Kontrolle der Gallensäuren-Homöostase zeigt die Wichtigkeit der Prävention eines zellulären Schadens. Entdeckt wurde FXR durch die Tatsache, dass eine schwache Aktivierung dieses Rezeptors durch Farnesolderivate in Rattenhepatozyten möglich war, anfänglich aber keine endogenen Liganden identifiziert werden konnten. Später wurden aber die eigentlichen Aktivatoren dieses Rezeptors identifiziert, welche die Gallensäuren sind (Parks *et al.* 1999). FXR bindet dabei CDCA und in einem geringeren Maße auch Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA), aber keine Cholsäure (CA). FXR fungiert in aktiviertem Zustand als Transkriptionsfaktor und beeinflusst direkt oder indirekt

die Expression seiner Zielgene (Clausel *et al.* 2011). FXR reguliert direkt die Expression von BSEP, MRP2 und OATP1B3. Eine indirekte Regulation der Genexpression findet sich beispielsweise für NTCP und CYP7A1 (Rizzo *et al.* 2005; Clausel *et al.* 2005). Diese indirekten inhibitorischen Effekte werden durch den *downstream* von FXR gelegenen nukleären Rezeptor der Klasse V und Ko-Repressor *short heterodimer partner 1* (SHP1; NR0B2) weitergeleitet und beinhalten den Einfluss weiterer nukleärer Rezeptoren (Abbildung 3). Somit wird die Biosynthese von Gallensäuren aus Cholesterin inhibiert, wobei FXR der Schlüsselregulator des enterohepatischen Gallensäurenmetabolismus ist (Goodwin *et al.* 2000). FXR interagiert mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR; NR2B). Als heterodimere Partner binden sie an FXR responsive Elemente (FXREs) in der Promotorregion ihrer Zielgene. Diese permissiven Heterodimere werden durch Bindung von FXR oder RXR Liganden aktiviert (Laffitte *et al.* 2000). In Abwesenheit eines Liganden für das FXR/RXR Heterodimer ruhen sie im Zellkern, gebunden an FXREs in einem Komplex mit transkriptionellen Ko-Repressoren wie *silencing mediator of retionic acid and thyroid hormone receptor* (SMRT) und *nuclear receptor co-repressor* (N-CoR). Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Komplexes und zur transkriptionellen Aktivierung der Zielgene. Alle nukleären Rezeptoren besitzen hoch konservierte Zink-Finger DNA-Bindungsdomänen, welche auch als Monomere in variabler Orientierung Teile der Response-Elemente ähnlicher Struktur binden können. FXR bevorzugt hier, nach Bindung von Gallensäuren an die Ligandenbindungsdomäne im C-terminalen Abschnitt des Proteins, eine invertierte Wiederholungssequenz 5'-AGGTCA-3', wobei die Monomere durch ein Nukleotid (1nt) getrennt sind (IR-1). Dies wurde durch Funktionsanalysen einer limitierten Anzahl an durch FXR aktivierten Promotoren belegt (Edwards *et al.* 2002).

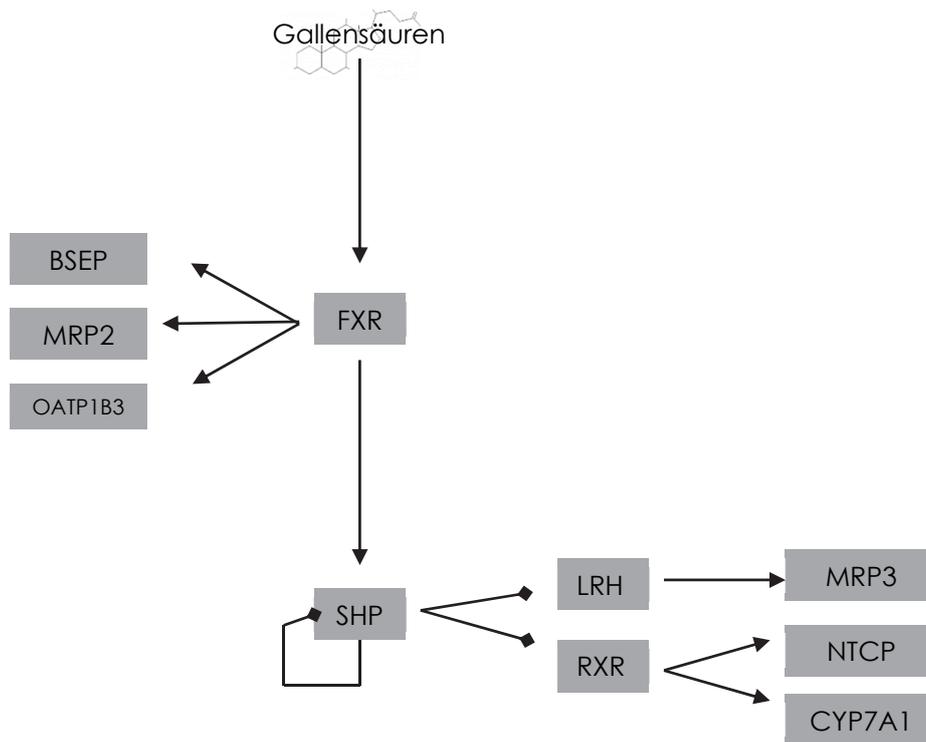


Abbildung 3 Die transkriptionelle Regulation der hepatobilären Transportproteine vermittelt durch direkte oder indirekte FXR-basierende Interaktion. FXR kann aktivierend (Dreieck) oder hemmend (Rhombus) auf die Genexpression der Transportproteine einwirken. Erläuterungen siehe Text.

1.7 Die cAMP-vermittelte Signalübertragung

Zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) wurde als erster *second messenger* identifiziert (Rall und Sutherland 1958; Sutherland und Rall 1958; Rall und Sutherland 1961; Kresge *et al.* 2005). Es spielt eine fundamentale Rolle in der zellulären Antwort auf viele verschiedene extrazelluläre Stimuli. Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion kontrolliert eine große Bandbreite zellulärer Prozesse wie Gentranskription, Zellmetabolismus, Proliferation und Entwicklung (Gancedo 2013). Für die spezifische Wirkung von cAMP in verschiedenen zellulären Aufgabenbereichen wurde anhand des omni-involvierten cAMPs die zelluläre Signalkompartimentierungstheorie aufgestellt (Antoni 2012). Den ersten Auslöser stellt der extrazelluläre Stimulus dar. Hier handelt es sich beispielsweise um Neurotransmitter, Hormone, inflammatorische Stimuli, Epinephrine, Norepinephrine oder Stress-Stimuli. Vereinfacht dargestellt bindet und aktiviert dieser extrazelluläre Ligand seinen spezifischen G Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) und aktiviert so die Mitglieder der Adenylylzyklase (ACs), welche ATP-vermittelt cAMP bilden. Der intrazelluläre *messenger* cAMP bindet nun an eine limitierte Anzahl intrazellulärer Effektoren, allen voran die Proteinkinase A (PKA), welche in aktiviertem Zustand nachgeschaltete Ziele der Signaltransduktion phosphoryliert (Zaccolo 2009). Diese sind beispielsweise der PI3K/Akt-Signalweg oder die Phospholipase C bzw. Proteinkinase C (PKC). Die Modulation vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren wird cAMP-abhängig durch die Aktivierung des cAMP responsiven Element (CRE)-bindenden Proteins (CREB) beeinflusst (Altarejos und Montminy 2011). Nach Phosphorylierung am Ser133 durch die freigesetzte und durch passive Diffusion in den Zellkern translozierte katalytische Untereinheit der PKA wird die CREB-Assoziation mit Aktivitäts-steigernden Ko-Faktoren (CBP; p300) gefördert und beeinflusst so zusammen mit dem Transkriptionsfaktor CREM die CRE-tragenden Promotoren (Walker und Habener 1996). So nimmt der Transkriptionsfaktor CREB eine wichtige Rolle im Lipid- und Glukosestoffwechsel des Körpers ein. Neuere Arbeiten konnten CREB weiterhin mit einer großen Anzahl Leber-spezifischer Gene in Verbindung bringen (Everett *et al.* 2013) sowie im Speziellen mit dem nukleären Transkriptionsfaktor FXR (Seok *et al.* 2014). Die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege kann die Aktivierung sogenannter Phosphodiesterasen (PDEs) nach sich ziehen, die für den Abbau von cAMP verantwortlich sind und so die Weiterleitung des Signals auf Grundlage einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration terminieren (Hertz *et al.* 2009). Dieses vereinfachte Modell einer linearen Signalweiterleitung ist allerdings zu simpel. Denn eine Schlüsselausstattung des cAMP-

Signalweges ist der hohe Grad an Diversität aller beteiligten Komponenten. So gibt es mehrere hundert GPCRs, deren Stimulus-aktivierte Untereinheiten entweder stimulierend (G_{α_s}) oder inhibierend (G_{α_i}) auf den intrazellulären cAMP-Spiegel wirken können (Alberts *et al.* 2012). Weitere Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine ($G\beta\gamma$) existieren in unterschiedlicher Kombination und beeinflussen wiederum ganz individuell die zehn verschiedenen Isoformen der ACs (Hanoune *et al.* 2001). AC1-9 existieren in Membran-gebundener Form und synthetisieren cAMP nach Bindung extrazellulärer Stimuli an GPCRs, während AC10, welche intrazellulär lokalisiert ist, unempfindlich gegenüber G-Proteinen ist und durch Ca^{2+} reguliert wird (Dufour *et al.* 2005). Die verschiedenen AC-Isoformen zeigen eine Gewebe-spezifische Verteilung. So findet man in der Leber vorrangig die Isoformen AC4-7 und AC9, wobei AC6 am häufigsten vorkommt (Defer *et al.* 2000; Edwards *et al.* 2002; Feldman 2002). Das gleichzeitige Auftreten vieler dieser Komponenten in einer Zelle macht es notwendig, ein komplexes und aufwendiges Netzwerk multipler Signalwege zu koordinieren, die Stimulus-abhängig gleichzeitig aktiviert werden, aber für eine adäquate Signalantwort ebenso koordiniert werden müssen. Dies erfordert eine strenge räumliche Kontrolle der Signal-Propagation, damit das Signal in definierten Bahnen des Netzwerks transduziert werden kann und eine spezifische zelluläre Antwort auf einen extrazellulären Reiz definiert werden kann. Notwendig sind dafür die in hoher Variabilität gewährleisteten molekularen Komponenten mit einer fast unbegrenzten Möglichkeit an Regulationsmechanismen und deren definierte, subzelluläre Lokalisation (Zaccolo 2011). Die experimentelle Untersuchung cAMP-abhängiger Signaltransduktion kann durch Aktivierung oder Hemmung der beteiligten molekularen Komponenten auf ebenso vielen Ebenen untersucht werden (Beispiele siehe Abbildung 4).

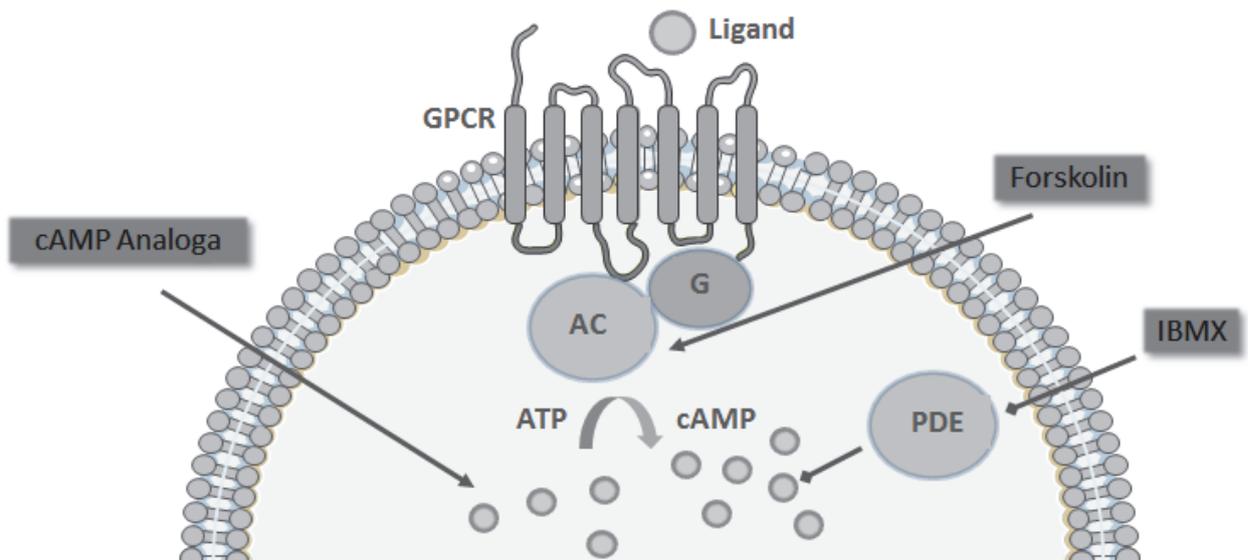


Abbildung 4 Einfluss natürlicher und synthetischer Agenzien auf den intrazellulären cAMP-Spiegel Die Bildung von cAMP aus ATP wird durch die Klasse der Adenylzykassen (ACs) katalysiert. Die Aktivität dieser Enzyme kann durch die Bindung des Aktivators Forskolin gesteigert werden. Phosphodiesterasen (PDEs) hydrolysieren cAMP zu 5'-AMP und wirken hemmend auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration. PDEs wiederum können durch IBMX in ihrer Wirkung gehemmt werden. Synthetische cAMP Analoga wie das 8-Bromo-cAMP wurden so konzipiert, dass sie die lipophile Zellmembran passieren und ihre Wirkung intrazellulär entfalten können.

1.8 Chemokine

Die Kommunikation zwischen Zellen kann über lösliche Moleküle und Mediatoren vermittelt werden. Zu diesen konzentrationsabhängigen und hoch wirksamen interzellulären Botschaftern gehört auch die heterogene Gruppe der Chemokine, deren Wirksamkeit über spezifische Rezeptoren vermittelt wird. Chemokine gehören zur Familie der chemotaktischen Zytokine, welche die Migration und Lokalisation verschiedener Zellpopulationen im Gewebe Stimulus-abhängig auslösen können (Allen *et al.* 2007). Die Zellen wandern dabei entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Konzentration. Es lassen sich homöostatische von inflammatorischen Chemokinen unterscheiden. Homöostatische Chemokine sind kontinuierlich an der Organisation und Aufrechterhaltung lymphoidaler Organe beteiligt. Inflammatorische Chemokine jedoch werden Stimulus-abhängig freigesetzt (Fernandez *et al.* 2002). Verletzungen, Infektionen und Entzündungssignale sind ein starker Stimulus und chronisch entzündliche Erkrankungen zeigen häufig eine erhöhte Chemokinexpression (Johnston *et al.* 1999). Einen positiven Einfluss nehmen Chemokine auf die Wundheilung und bei der Genesung von Infektionen (Gillitzer *et al.* 2001). Weiterhin regulieren Chemokine ebenfalls entwicklungsbiologische Prozesse wie Hämatopoese, Angiogenese und Kardiogenese. Das gleiche Potential kann aber ebenso bei pathologischen Prozessen wie der Vaskularisierung und der Progression von Tumoren eine Rolle spielen (Savarin-Vuillat und Ransohoff 2007). Im Gegensatz zu den Zytokinen weisen Chemokine stark konservierte strukturelle Motive auf. Sie binden in unterschiedlicher Affinität verschiedenen Chemokinrezeptoren und vermitteln ihre Signale über G-Proteine (Murphy *et al.* 2000). Das Chemokinsignal wird dabei nach Bindung an den extrazellulären Bereich des Rezeptors durch Konformationsänderung über den Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins vermittelt (Savarin-Vuillat und Ransohoff 2007). Die intrazelluläre Signalweiterleitung vollzieht sich nun über verschiedenste Signalwege wie z.B. den MAP-Kinase-Signalweg und kann über cAMP als intrazellulären Botenstoff geschehen (Zhao *et al.* 2014). Die ungefähr 50 bekannten Chemokine lassen sich anhand der Position der Cysteinreste am Amino-terminalen Ende in vier Gruppen einteilen: C, CC, CXC und CX3C (C= Cystein: X= jede mögliche Aminosäure) (Zlotnik und Yoshie 2000). Die Gruppe der CXC-Familie beinhaltet 17 (Maus 15) Mitglieder und kann weiter anhand des Vorkommens einer bestimmten Sequenzabfolge der Aminosäuren, dem ELR-Motiv, unterteilt werden. ELR⁺ Chemokine fördern die Zellproliferation und die Angiogenese, zu ihnen gehören u.a. CXCL 1-3 und

CXCL 5-8. ELR- Chemokine wirken dagegen hemmend auf diese Prozesse. Die CXC-Chemokine werden vor allem von Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen produziert, aber auch von den Leberzellen selbst (Rowell et al. 1997; Kuboki et al. 2008;). Sie wirken auf das Immunsystem indem sie die Migration und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten auslösen (Strieter et al. 2004).

Tabelle 2 Humane und murine Mitglieder der CXC-Chemokin-Familie (nach Zlotnik und Yoshie, 2012)

Systemischer Name	Ligand		Rezeptor	Kategorie	
	human	murin		ELR	Inflammatorisch
CXCL1	GRO α	Gm1960	CXCR2	+	+
CXCL2	GRO β	MIP-2	CXCR2	+	+
CXCL3	GRO γ	KC	CXCR2	+	+
CXCL4	PF4	-	CXCR3-B	-	-
CXCL4L1	PF4V1	-	CXCR3-B	-	-
CXCL5	ENA78	-	CXCR2	+	+
CXCL6	GCP2	LIX	CXCR1/2	+	+
CXCL7	NAP-2	-	CXCR1/2	+	+
CXCL8	IL-8	-	CXCR1/2	+	+
CXCL9	MIG	-	CXCR3	-	-
CXCL10	IP-10	-	CXCR3	-	-
CXCL11	I-TAC	-	CXCR3/7	-	-
CXCL12	SDF-1	-	CXCR4/7	-	-
CXCL13	BLC	-	CXCR3/5	-	-
CXCL14	BRAK	-	unbekannt	-	-
-	-	Lungkine	unbekannt	-	k.A.
CXCL16	SR-PSOX	-	CXCR6	k.A.	+
CXCL17	DMC	-	unbekannt	k.A.	k.A.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Eine Reihe von Arbeiten belegen, dass pro-inflammatorische Zytokine für die Entstehung einer Sepsis-induzierten Cholestase verantwortlich sind. Hierbei kommt es auf verschiedenen Ebenen zu einer Hemmung der Oberflächenexpression von Transportproteinen. Dies beinhaltet die Endozytose von Transportproteinen sowie deren Abbau und die Hemmung des Nachschubs auf Ebene der Genexpression. Es ist bekannt, dass pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-1 β und TNF α die Expression des Gallensalztransporters BSEP auf Transkriptebene hemmen. Zielsetzung dieser Arbeit war die weitergehende Charakterisierung der Mechanismen, über die IL-1 β die Gallensäure-vermittelte Expression des BSEP Gens unterdrückt. Ein besonderer Schwerpunkt lag hierbei auf der Frage, inwieweit autokrine Mechanismen sowie die Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels hier eine Rolle spielen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

• Aprotinin	Sigma Aldrich Chemie	München
• APS	Serva	Heidelberg
• Benzamidin	Sigma Aldrich Chemie	München
• Bradford Protein Assay	Biorad	München
• BSA	PAA Laboratories	Linz, Österreich
• Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich Chemie	München
• DMSO	Sigma Aldrich Chemie	München
• DNase Set	Qiagen	Hilden
• ECL Western Lightening	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
• Ketavet	Pfizer	New York, USA
• NaCl (0,9%)	B. Braun	Melsungen
• PBS	Biochrom	Berlin
• Pefablock	Fluka	St. Gallen, Schweiz
• PMSF	Roche	Mannheim
• Polyacrylamid	Applichem	Darmstadt
• Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Mannheim
• Protein Standard	Biorad	München
• Rompun	Bayer Healthcare	Leverkusen
• RT ² Syber Green	Qiagen	Hilden
• SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Darmstadt
• TEMED	Sigma Aldrich Chemie	München
• Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie	München

2.1.2 Medien, Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur

• 8-Bromo-cAMP	Sigma Aldrich Chemie	München
• 8-Methoxymethyl-IBMX	Sigma Aldrich Chemie	München
• CDCA	Sigma Aldrich Chemie	München
• Kollagen	Roche	Mannheim
• Kollagen Typ I	BD Biosciences	San Diego, USA
• Kollagenase Typ I-A	Sigma Aldrich Chemie	München
• Cpd 19	Calbiochem	Darmstadt
• CXCL 1 und 2 (Standard)	R&D Systems	Wiesbaden
• CXCL 1 und 2	Peptotech	Hamburg
• CXCL 1 und 2	Cell Signaling	Denver, MA, USA
• CXCL 1, 2 und 5	Sigma Aldrich Chemie	München
• Dexamethason	Sigma Aldrich Chemie	München
• DMEM	Biochrom	Berlin
• DMEM (10x)	Sigma Aldrich Chemie	München
• FCS	Biochrom	Berlin
• Forskolin	Sigma Aldrich Chemie	München
• Glutamin	Gibco Life Technology	Karlsruhe
• Hemisuccinat-Hydrocortison	Sigma Aldrich Chemie	München
• IBMX	Sigma Aldrich Chemie	München
• Il-1 β (human)	Roche	Mannheim
• Il-1 β (murin)	Jena Bioscience	Jena
• Insulin	Sigma Aldrich Chemie	München
• PBS	Biochrom	Berlin
• Penicillin	Gibco Life Technology	Karlsruhe
• SB 225002	Tocris Bioscience	Bristol, UK
• Streptomycin	Gibco Life Technology	Karlsruhe
• TNF α (murin)	Roche	Mannheim
• Trypsin-EDTA	CytoGen	Sinn
• Williams' Medium E	Biochrom	Berlin

Alle weiteren Chemikalien wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma Aldrich Chemie (München) bezogen und wiesen den Reinheitsgrad *pro analysi* auf.

2.1.3 Spezielle Materialien und Geräte

• Abboath	Venisystems, Hospira	München
• Abboath 26G x 19 mm	VENISYSTEMS	Lake Forest, IL, USA
• Blotting-Kammer	Biometra	München
• <i>Cell Observer</i>	Zeiss	Jena
• Zentrifuge 5810R	eppendorf	Hamburg
• CO ₂ Inkubator HERACELL 150i	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
• EASYstrainer 70 µm	greiner bio-one	Frickenhausen
• Einmalskalpell	FEATHER	Osaka, Japan
• Elektrophorese-Kammer	Biometra	München
• Feinwaage 770	KERN	Balingen
• Filmentwickler Curix 60	AGFA	Köln
• Filterpapier Whatman	Whatman	Maidstone, UK
• Filtrapur S 0.2 µm Sterilfilter	SARSTEDT	Nümbrecht
• HERA SAFE KS Sterilbank	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
• Hyperfilm ECL	Amersham, GE	München
• <i>Large Cell Separationssäulen</i>	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
• Luminoskan RT	Labsystems	Needham, MA, USA
• Mikroskop	Olympus	Hamburg
• MR Hei-Mix L Magnetrührer	Heidolph	Schwabach
• MS Separationssäulen	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
• <i>Multiskan plate reader</i>	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
• Nano Drop	NanoDrop Technol.	Wilmington, USA
• Neubauer Zählkammer	Assistent	Sondheim v.d. Röhn
• OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
• Orbitalschüttler 3011	GFL	Burgwedel
• Original Perfusor Syringe	BRAUN	Melsungen
• pH-Meter	WTW	Weilheim
• Spektralphotometer 2100 Pro	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
• Power Pack P25T	Biometra	München
• Präparationsbesteck	Aesculap	Tuttlingen
• QIAshredder	Qiagen	Hilden
• Röntgenfilm BioMax Light-1	Kodak	Rochester, NY, USA
• Roll-Mixer SRT6	Stuart	Staffordshire, UK

• Schlauchpumpe	Ismatec GmbH	Wertheim-Mondfeld
• Schlauchsystem Perfusion	BRAUN	Melsungen
• Sterican-Kanülen 23G	Braun	Melsungen
• Thermomixer compact	eppendorf	Hamburg
• ViiA7 RT-PCR System	Applied Biosystems	Darmstadt
• Vortex Genie 2	Scientific industries	Bohemia, NY, USA
• Waage 440-49N	KERN	Balingen
• Wasserbad E5	Medingen	Arnsdorf
• Zellschaber	BD Falcon	Bedford, MA, USA
• Zentrifuge 5415R	eppendorf	Hamburg

Die Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammten von der Firma Greiner (Frickenhausen) und Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg)

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

HANKS Puffer

137 mM	NaCl
5 nM	KCL
15 mM	Hepes
0,33 mM	Na ₂ HPO ₄
0,44 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4

Puffer Perfusion I

200 ml	HANKS Puffer
800 µl	EGTA 0,5 M
2 ml	Glucose 10 %

Puffer Perfusion II

HANKS Puffer

1 ml CaCl₂ 5 mM
1 ml Glucose 10 %
30 mg Kollagenase

MACS Puffer

0,5 % BSA
2 mM EDTA
PBS
pH 7,2

Attachment Medium

500 ml Williams' Medium E
50 ml FCS
1 % Pen/Strep
2 mM L-Glutamin
100 nM Dexamethason

Pre-Starvation Medium

500 ml Williams' Medium E
1 % Pen/Strep
2 mM L-Glutamin
100 nM Dexamethason

Starvation Medium

500 ml Williams' Medium E
1 % Pen/Strep
2 mM L-Glutamin

HepaRG Vollmedium

500 ml Williams' Medium E
50 ml FCS
1 % Pen/Strep
2 mM L-Glutamin

5x10⁻⁵ M Hydrocortison-Hemisuccinat

5 µg/ml Insulin

Einfriermedium

HepaRG Vollmedium

20 % FCS

10 % DMSO

Triton-Lysepuffer

136 mM NaCl

20 mM Tris-HCl

10 % Glycerin

2 mM EDTA

50 mM β-Glycerophosphat

20 mM Na-Pyrophosphat

0,2 mM Pefablock

5 µg/ml Aprotinin

5 µg/ml Leupeptin

4 mM Benzamidin

1 mM Na₃VO₄

1 % Triton X 100

In H₂O lösen
pH 7,4

+ 0,2 % SDS zur Verwendung

10x Blotting Puffer (5 l)

15 g SDS

145 g Glycin

290 g Tris

1x Blotting Puffer (5 l)

0,5 l 10x Blotting Puffer

1 l Methanol

3,5 l H₂O

5x Elektrophorese-Puffer

25 g SDS

75,5 g Tris

470 g Glycin

2x SDS Ladepuffer

0,2 % Bromphenolblau

20 % Glycerin

4 % SDS

100 mM Tris/HCl pH 6,8

200 mM DTT (vor Gebrauch dazu)

10x TBS Puffer (5 l)

120 g Tris

435 g NaCl

pH 7,6

TBS-T Puffer

0,1 % Tween in 1x TBS

2.1.5 Oligonukleotide (Primer RT-PCR)

Die Oligonukleotide für die quantitativen Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR wurden von der Firma MWG Biotech bezogen und nach Herstellerangaben gelöst (100 pg/μl). Für die praktische Reaktionsanwendung wurden die korrespondierenden Primerpaare erneut 1:10 verdünnt (Endkonzentration 10 pg/μl).

Tabelle 3 Murine und humane Oligonukleotid-Primersequenzen für die qRT-PCR

Primer murin	sense	antisense
BSEP	TGCTGACAGGATTCGCTTCTC	TTGCTAAGGGGCTTCGTTGGT
SDHA	CTTCGCTGGTGTGGSTGTCA	GTGGGAATCCCACCCATGT
Primer human	sense	antisense
BSEP	ACTAGATGAAGCCACTTCTGCCTTA	TGCACCGTCTTTTCACTTTCTGT
UBC	CGTCACTTGACAATGCAGATCTTCG	CCTCGAGGGTGATGGTCTTACC
HPRT 1	AGGTCGCAAGCTTGCTGG	CCAACACTTCGTGGGGTCC

2.1.6 Antikörper (Western Blot)

Tabelle 4 Liste der für die Western Blot Analyse verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Wirt	Hersteller
anti Erk 1/2	Kaninchen	Cell Signaling (Denver, MA, USA)
anti phospho Erk 1/2 Thr202/Tyr204	Kaninchen	Cell Signaling (Denver, MA, USA)
anti Akt Ser473	Kaninchen	Cell Signaling (Denver, MA, USA)
anti phospho Akt Ser473	Kaninchen	Cell Signaling (Denver, MA, USA)
anti GAPDH	Maus	Meridian Life Science (Memphis, USA)

Sekundärantikörper	Wirt	Konjugat	Hersteller
anti Kaninchen	Ziege	HRP	Dako (Hamburg, Deutschland)
anti Maus	Kaninchen	HRP	Dako (Hamburg, Deutschland)

2.1.7 Molekularbiologische Kits

• Anti-Ly-6G Microbead Kit	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
• CellTiter Assay	Promega	Madison, WI, USA
• CXCL 1/KC ELISA mouse	R&D Systems	Wiesbaden
• CXCL 2/MIP-2 ELISA mouse	R&D Systems	Wiesbaden
• CXCL 5/LIX ELISA mouse	R&D System	Wiesbaden
• Cyclic AMP XP Assay Kit	Cell Signaling	Denver, MA, USA
• Proteom Profiler Kit	R&D Systems	Wiesbaden
• QCM™ 3 µm Chemotaxis Assay	Millipore	Eschborn
• QuantiTect cDNA Synthesis Kit	Qiagen	Hilden
• RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden
• RT ² First Strand Kit	Qiagen	Hilden
• RT ² Profiler PCR Array	Qiagen	Hilden

2.1.8 Verwendete Zelllinien und primäre Zellpräparationen

• HepaRG	Humane Hepatoma-Zelllinie, welche distinkte Charakteristiken primärer humaner Hepatozyten aufweist (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
• Hepatozyten	murine Primärzellen aus eigener Präparation
• Neutrophile Granulozyten	aus murinem Knochenmark präpariert

2.1.9 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

wt C57BL/6J wildtyp, männlich, 8-12 Wochen (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich)

fxr^{-/-} C57 BL/6J FXR-Gendeletion, männlich, 8-12 Wochen (zur Verfügung gestellt von Karl Lang, Universität Essen)

il1r1^{-/-} C57 BL/6J IL1R1-Gendeletion, männlich, 8-12 Wochen (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine, USA)

Die Haltung und Zucht der Versuchstiere erfolgte unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf. Die Tiere wurden unter einem strikten Tag-Nacht-Zyklus (12 h / 12 h) bei 22 °C und 50 % rF und freiem Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter gehalten. Für die Versuche wurden Tiere im Alter von acht bis zwölf Wochen verwendet. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt, und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt und entsprechend des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation muriner Hepatozyten

Die Präparation muriner Hepatozyten erfolgte durch eine *in situ* Perfusion der Leber mittels eines dualen Puffersystems. Zunächst wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Rompun und Ketavet (Rompun 0,5 mg/100 g KG; Ketavet 10 mg/100 g KG in 0,9 % NaCl) narkotisiert. Nach gesicherter Feststellung des Erlöschens der Reflexe (Toleranzstadium), wurde per Längsschnitt die Bauchhöhle eröffnet und die Leber und V. *portae* freigelegt. Mittels Abbocath wurde die Vene kanüliert und an das Puffer-führende Schlauchsystem angeschlossen. Nun erfolgte die Durchtrennung der V. *cava inferior* zur Druckentlastung. Mittels Schlauchpumpe wurde im ersten Perfusionsschritt 3 Minuten lang der Perfusionspuffer I mit einem Volumenstrom von 8 ml/min durch die Leber geleitet und so das Blut aus der Leber gespült und durch den Zusatz von EGTA im Perfusionspuffer I der Zellverband der Leber durch Ca^{2+} Depletion gelockert. Anschließend erfolgte mittels 3-Wege-Hahn die Umstellung auf den Kollagenase-haltigen Perfusionspuffer II, der bei gleicher Volumenstromstärke und 2-3 Minuten langer Laufzeit für eine Lösung der Hepatozyten aus dem Zellverband sorgte. Makroskopische Kennzeichnung dafür waren Marmorierung der Organoberfläche und das beginnende Anschwellen der Leber. Die Leber wurde aus dem Bauchraum frei präpariert und in Kultivierungsmedium (Attachment-Medium) überführt. Unter sterilen Bedingungen wurde mittels Pinzette die Leberkapsel geöffnet und die Hepatozyten sanft im Kultivierungsmedium ausgeschüttelt. Die Zellen wurden über ein Zellsieb (70 μm) gefiltert und durch drei Zentrifugationsschritte (3', 50 rcf, RT, Acc 2, Dec 2) und Dekantieren des Kulturüberstands von den Nicht-Parenchymzellen getrennt. Die Kontrolle der Zellzahl und Zellvitalität wurde mittels Tryphanblau-Ausschluss bestimmt.

2.2.1.2 Aufreinigung primärer Hepatozyten

Bestimmte Versuchsbedingungen erfordern eine weitere Aufreinigung der Hepatozyten über die oben genannten Zentrifugationsschritte hinaus. Die hier verwendete Aufreinigungsmethode erfolgt unter Verwendung von CD11b-bindenden Antikörpern, die an magnetische Kügelchen gekoppelt sind. Somit werden CD11b positive Zellen (z. B. Lebermakrophagen) aus einer Zellsuspension entfernt. Hierzu wurden die Zellen zur Entfernung des Mediums 3 Minuten bei 50g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen im Restvolumen resuspendiert und 100 µl der CD11b-Beads zugefügt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4 °C wurde das Volumen mittels MACS-Puffer auf 10 ml erhöht und die Zellsuspension auf äquilibrierte Separationssäulen (*Large Cell*) im magnetischen Feld (Octo MACS Separator) gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen, die Zellen zentrifugiert und in *Attachment*-Medium resuspendiert. Die vitale Zellzahl wurde erneut mittels Trypanblau bestimmt.

2.2.1.3 Die *monolayer*-Kultur primärer Hepatozyten

Bei der Kultivierung primärer Hepatozyten als *monolayer* (ML) wurden die frisch präparierten Zellen nach Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau auf zuvor mit Kollagen I (1:100 in H₂O) beschichteten Zellkulturplatten in *Attachment*-Medium ausgesät (2x10⁶ Zellen/6-Loch-Platte; 1x10⁶ Zellen/PS). Nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank und der mikroskopischen Kontrolle der Adhäsion der Zellen an der Zellkulturplatte, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in *Pre-Starvation*-Medium über Nacht im Brutschrank (37 %, 5 % CO₂) belassen. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen am Folgetag entweder vor Versuchsbeginn zweimal mit PBS gewaschen und für Stimulationsversuche in *Starvation*-Medium kultiviert, oder der Versuchsbeginn erfolgte ohne vorherigen Wechsel des Kulturmediums.

2.2.1.4 Die *sandwich*-Kultur primärer Hepatozyten

Die Kultivierung primärer Hepatozyten, eingebettet zwischen zwei Schichten Kollagen in einer 3D-Matrix, nennt man *sandwich*-Kultur (SC). Diese Kultivierungsform simuliert den *in situ* existierenden Zellverband im Gewebe der Leber und infolgedessen wird so einer De-Differenzierung der Hepatozyten, wie es nach bereits zwei Tagen in der *monolayer*-Kultur der Fall ist, entgegengewirkt. Kennzeichen einer erfolgreichen *sandwich*-Kultur primärer Hepatozyten ist der Erhalt der Zellmorphologie und die Ausbildung von Gallengängen (Kanalikuli) zwischen den Zellen. Zur Ausbildung des Kollagen-*sandwichs* wurde Kollagen (Roche, Mannheim) in 0,2 % Essigsäure gelöst (1,0 mg/ml). Zur Neutralisation wurde 10x DMEM verwendet, welches Phenolrot als pH-Indikator enthält und mittels Zugabe von 1 M NaOH wurde ein neutraler pH-Wert eingestellt, um eine optimale Konsistenz und einen bestmöglichen Polymerisierungsgrad der Kollagen-Matrix zu erhalten. Die primären Hepatozyten wurden mit $0,8 \times 10^6$ Zellen/Loch in einer 6-Loch Platte kultiviert. Zunächst wurde mit 350 μ l pro Loch die untere Kollagenschicht aufgebracht, welche nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C im Brutschrank die erforderliche Festigkeit aufwies und die Zellen in *Attachment*-Medium ausgesät werden konnten. Nach drei Stunden Inkubationszeit wurden die Hepatozyten dreimal mit PBS gewaschen, um Debris und tote Zellen zu entfernen und die obere Schicht der *sandwich*-Kultur, ebenfalls mit 350 μ l/Loch der neutralisierten Kollagenlösung, wurde nun auf die verbleibenden, vitalen Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken verteilt. Nach einer Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 2 ml/Loch *Pre-Starvation*-Medium hinzugegeben.

2.2.1.5 Präparation neutrophiler Granulozyten

Die Präparation neutrophiler Granulozyten wurde aus dem Knochenmark von 8–12 Wochen alter Wildtyp-Mäuse vorgenommen. Der erste Schritt beinhaltete die Abtrennung der Hinterbeine aus der Hüftgelenkspfanne und die vorsichtige Entfernung der die Ober- und Unterschenkelknochen umschließenden Muskulatur. Die freipräparierten Knochen wurden mit 2-Propanol und DMEM-Medium (4,5 g/l Glucose, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) gespült und im zweiten Schritt mittels einer Knochenschere die Abtrennung der Knochenenden vorgenommen, um die Röhrenknochen zu eröffnen und das Ausspülen des Knochenmarks mittels Kanüle (23G) und DMEM-Medium aus der Markhöhle zu ermöglichen. Nach Resuspension wurde die Zellsuspension filtriert

(Porengröße 70 µm) und das Filtrat zentrifugiert (600 rcf, 10', 4°C). Das nun gebildete Pellet wurde in 1 ml ACK-Puffer (8,02 g/l NH₄Cl, 0,1 g/l KHCO₃, 0,037 g/l EDTA; pH 7,3) resuspendiert, welcher für die Lyse der restlichen, noch enthaltenen Erythrozyten sorgte und den Reinheitsgrad der neutrophilen Granulozyten in der Suspension dementsprechend erhöhte. Die Reaktion wurde nach einer Minute durch die Zugabe des vier-fachen Volumens an DMEM-Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und nach der Aufnahme des Zellpellets in einem definierten Volumen an Nährmedium nach Resuspension mittels Tryphanblau-Ausschluss die Zellzahl bestimmt. Zur weiteren Aufreinigung wurde ein Anti-Ly-6G Microbead Kit und die positive MACS-Selektion eingesetzt. Die Zellen wurden mit anti-Ly-6G-Biotin (50 µl/1x10⁸ Zellen) für 10 min und anschließend mit anti-Biotin MicroBeads (100 µl/ 1x10⁸ Zellen) für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach den Inkubationen wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen (300 rcf, 10 min, 4 °C) und in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden auf die MS-Separationssäule (Miltenyi) gegeben und nach Durchlauf der Zellen wurde die Säule dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Die Separationssäulen wurden aus dem Magnetfeld entfernt und die verbliebenen Zellen in den Säulen mit 1 ml MACS-Puffer und sterilem Säulenstempel eluiert. Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden in DMEM aufgenommen und für weitere Experimente verwendet.

2.2.1.6 Migration

Das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten unter der Verwendung bestimmter Stimulantien wurde mittels des Chemotaxis-Assay von Millipore gemessen. Nach der Präparation der neutrophilen Granulozyten aus murinem Knochenmark und der oben beschriebenen Aufreinigung über die MACS Selektion wurden die Zellen in Serum-freiem DMEM in einer Konzentration von 0,2 – 2,0 x 10⁶ Zellen/ml aufgenommen. 250 µl dieser Suspension wurde pro Migrations-Einsatz (Membran-Porengröße 3 µm) ausgesät. In die Einsatzkammer wurde pro Migrations-Einsatz 400 µl Medium (+/- Stimulans), oder als Positivkontrolle Kulturüberstand kultivierter Hepatozyten nach Inkubation mit bestimmten Wachstumsfaktoren und Zytokinen pipettiert. Die Zellen wurden für 20 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Stimulantien-abhängige Migration der neutrophilen Granulozyten durch die Membran des Migrations-Einsatzes in Richtung des Chemokingradienten. Die Anzahl der migrierten Zellen ließ sich durch Entfernung des Migrationseinsatzes und Zugabe von 30 µl WST-1 Reagenz in die

Einsatzkammer durch die Proportionalität zwischen Zellzahl und der enzymatischen Bildung von Formazan photometrisch (450 – 630 nm) bestimmen. Als Kontrolle diente Kultivierungsmedium ohne Zellen.

2.2.1.7 Kultivierung der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG

Die HepaRG Zelllinie ist eine humane Vorläufer-Zelllinie, die noch viele Charakteristiken primärer humaner Hepatozyten aufweist. Darunter fallen die ähnliche Zellmorphologie und die Expression von metabolischen Schlüsselenzymen, nukleären Rezeptoren und Transportproteinen. HepaRG Zellen sind bipotente, hepatische Vorläuferzellen, welche sich terminal in zwei distinkte, hepatische Zelltypen differenzieren, die Hepatozyten-ähnlichen Zellen und die biliären Zellen. Eine voll differenzierte HepaRG Zellpopulation besteht zu ~50 % aus beiden Zelltypen. Die HepaRG Zelllinie terminal differenzierter hepatischer Zellen stammt ursprünglich von einem differenzierten, humanen Hepatom, welches einem Patient am *Institut national de la santé et de la recherche médicale* (Inserm) in Frankreich entnommen wurde (Gripon *et al.* 2002)

Die kryokonservierten HepaRG Zellen (10×10^6 Zellen/ml) wurden von Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) bezogen und in p75 Zellkulturflaschen oder 6-Loch-Platten in HepaRG Vollmedium kultiviert. Die Sub-Kultivierung bei einer Konfluenz von 80 – 100 % der Wachstumsfläche wurde durch 2 Minuten Inkubation der mit PBS gewaschenen Zellen mit Trypsin/EDTA bei 37 °C im Brutschrank ermöglicht. Nach Kontrolle des Adhärenz-Verlustes der Zellen wurde die Reaktion mit dem vier-fachen Volumen Nährmedium gestoppt, zentrifugiert (300 g, 10', RT) und ausgesät. Zum Einfrieren von Zellen wurden 50 – 60 % konfluente p75 Zellkulturflaschen ($\sim 3 \times 10^6$ Zellen) verwendet. Nach dem Vorgehen gemäß des Sub-Kultivierungsprotokolls wurde die Zellsuspension zentrifugiert (201 g, 5', 4 °C) und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt und für die Lagerung in Stickstoff vorbereitet.

Zur Versuchsvorbereitung wurden 2×10^6 Zellen/6-Loch-Platte ausgesät und zwei Wochen lang mit HepaRG Vollmedium versorgt. Zur vollständigen Differenzierung der Zellen wurde danach dem Nährmedium für zwei Wochen 2 % DMSO zugesetzt, das alle drei Tage gewechselt wurde. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde den Zellen Kultivierungsmedium ohne DMSO zugesetzt.

2.2.1.8 RT² Profiler PCR Array „Chemokine und Rezeptoren (Maus)“

Das RT² Profiler PCR Array „Chemokine und Rezeptoren“ detektiert die Expression von 84 Genen, kodierend für murine Chemokine und Rezeptoren. Das Array enthält, lyophilisiert in den Vertiefungen einer 96-Loch-Platte, Oligonukleotid-Primer für die Mitglieder der CC- und CXC-Motiv-Unterfamilien und den assoziierten Rezeptoren sowie viele weitere, in Beziehung dazu stehende Gene. Die komplette Liste der detektierbaren Gene wird im Anhang aufgeführt. Des Weiteren werden verschiedene *Housekeeping*-Gene und Kontrollen zur genomischen DNA-Kontaminierung, reversen Transkriptionseffizienz und Polymeraseketten-Reaktionseffizienz mitgetestet. Das RT² Profiler PCR Array wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und mit den vorgegebenen Einstellungen gemessen und ausgewertet (Messung mit dem ViiA7 RT-PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt). Die Herstellung der Proben erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben mit den vorgeschriebenen Reagenzien und Methoden und entsprach den vorausgesetzten Qualitätskontrollen.

2.2.1.9 cAMP XP Chemiluminescent Assay

Das cAMP XP Chemiluminescent Assay ist ein kompetitives, Enzym-gekoppeltes Immuno-Assay. Das in Zellen oder Gewebe von Interesse vorkommende cAMP konkurriert bei Anwendung dieses Assays mit einer distinkten Menge fixiertem und HRP-gekoppeltem cAMP um die Bindung an einen spezifischen, monoklonalen anti-cAMP Antikörper immobilisiert auf einer Messplatte. Durch Zufügung eines chemilumineszenten Reagenz ist eine Signalentwicklung durch ein Luminometer als Angabe in *Relative Light Units* (RLU) mess- und auswertbar. Das Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Messung am Luminoskan RT (Labsystems, Needham, MA, USA) vorgenommen.

2.2.1.10 Zytotoxizitäts-Assay

Das CellTiter96® AQueous One Solution Assay (Promega, Madison, WI, USA) bedient sich einer kolorimetrische Methode, welche die Menge an Formazanbildung (reduzierte, rote Form des Redoxfarbstoffs Tetrazolium) als Grundlage nutzt um die Menge der Absorption bei 490 nm als Basis für die Bestimmung der direkten proportionalen Anzahl lebender Zellen in einer Kultur zu bestimmen. Die Formazan-Bildung (Reduktion) erfolgt durch Dehydrogenasen der Atmungskette lebender Zellen. Somit lässt sich dieses Assay für die Messung von Proliferations- und Zytotoxizitäts-Versuchen einsetzen. Das Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte photometrisch am *Multiskan plate reader* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Proteinlysaten aus ML-Kultur

Nach Beendigung der jeweiligen Versuchsabläufe wurden die kultivierten Zellen dreimal mit kaltem PBS (supplementiert mit 0,1 mM Na₃VO₄) gewaschen und nach Zugaben von 100 µl Triton-Lysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die vollständige Vermengung von Puffer und Zellen zur adäquaten Zellyse wurde durch kurzes vortexen erreicht, gefolgt von einer 10 Minuten Inkubation auf Eis. Anschließend wurde durch Zentrifugation (16 000 rcf, 20', 4 °C) die sich in Lösung befindlichen Proteine von den Zellresten getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde kurzfristig bei -20 °C gelagert. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der aus ML-Präparationen gewonnenen Proteinlysate wurde mit Hilfe des kolorimetrischen Bradford Protein Assays (Biorad, Göttingen) bestimmt (Bradford 1976). Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bindet an kationische und unpolare Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung und bildet Komplexe. Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben. Dies erhöht den Extinktionskoeffizient des gebildeten Komplexes

im Gegensatz zur nicht-gebundenen Form des Farbstoffs und kann photometrisch bestimmt werden. BSA-Standardreihen wurden als Referenzmaß zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

2.2.2.3 Western Blot

Zur weiteren Analyse der präparierten Proteinlysate wurde die Auftrennung löslicher und Membran-gebundener Proteine nach ihrer Masse (in kDa) in vertikalen Gelkammern durchgeführt. Aufgetragen wurde pro Probe 10 – 30 µg Protein, welches zuvor mit 2x-SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C 5 Minuten denaturiert wurde. Die Auftrennung in Polyacrylamid-Gelen (5 % PAA-Konzentration Sammelgel; 10 % PAA-Konzentration Trenngel) wurde bei einer Spannung von 100 – 180 V durchgeführt.

<u>Polyacrylamid-Sammelgel (5 %, 5ml)</u>	3, 4 ml	H ₂ O
	0,83 ml	30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1
	0,63 ml	1 M Tris/HCl (pH 6,8)
	0,05 ml	10 % SDS
	0,05 ml	10 % APS
	0,005 ml	TEMED

<u>Polyacrylamid-Trenngel (10 %, 15 ml)</u>	5,9 ml	H ₂ O
	5,0 ml	30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1
	3,8 ml	1 M Tris/HCl (pH 8,8)
	0,15 ml	10 % SDS
	0,15 ml	10 % APS
	0,006 ml	TEMED

Nach Auftrennung der Proteine auf Basis ihrer Masse durch die SDS-Gelelektrophorese, wurden die Proteine mittels Elektrotransfer nach dem „Semi-dry“-Blotting-Verfahren bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² und einer Transferzeit von 90 Minuten auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zum Blockieren und Sättigen von unspezifischen Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach Beendigung des Proteintransfers eine Stunde lang in 5 % BSA/TBST schüttelnd bei RT inkubiert. Die anschließende Inkubation zur

Bindung des nicht-markierten Primärantikörpers erfolgte schüttelnd bei 4 °C ÜN. Vor und nach der Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die Membran 3 Mal je 15 Minuten mit Waschpuffer (TBS-T) gewaschen. Die Immundetektion erfolgte mittels ECL *Western Lightening* Reagenz (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und ECL-Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham, GE, München) in einer Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA, Köln)

2.2.2.4 ELISA

Die Konzentration der durch murine Hepatozyten produzierten Chemokine CXCL 1 (KC), CXCL 2 (MIP-2) und CXCL5 (Lix) nach Stimulation mit IL-1 β wurde mittels der Antikörperbasierten Bestimmungsmethode ELISA nach Herstellerangaben gemessen. Die Bestimmung erfolgte mit Zellkulturüberstand, welcher nach Zentrifugation (16 000 rcf, 20', 4 °C) unverdünnt eingesetzt wurde. Die Messung wurde photometrisch bei 450 nm (Korrektions-Wellenlänge 540 nm) am Multiskan *plate reader* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) durchgeführt.

2.2.2.5 Proteom *Profiler Array*

Das Proteom *Profiler Array* ist ein Membran-basierendes Immuno-Assay. Die zu untersuchenden Proben werden mit einer Mixtur biotinylierter Detektionsantikörper versetzt und anschließend mit der *Array*-Membran inkubiert. Diese enthält 25 spezifische Antikörper als Dublikate zur Detektion von murinen Chemokinen. Das Proteom *Profiler Mouse Chemokine Array* wurde nach Angaben des Herstellers mit Zellkulturüberstand von primären murinen Hepatozyten durchgeführt. Diese wurden mit IL-1 β stimuliert. Der Zellkulturüberstand nicht stimulierter PMHs diente als Kontrolle. Die Immundetektion erfolgte mittels Streptavidin-HRP Lösung und Röntgenfilmen (BioMax Light-1, Kodak, Rochester, USA) in einer Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA, Köln). Die Auswertung wurde durch die Software ImageJ (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA) ermöglicht.

2.2.3 RT-PCR

2.2.3.1 RNA Präparation

Die RNA Präparation aus Hepatozyten der ML-Kultur erfolgte mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Zur Präparation der RNA aus Hepatozyten, die im Kollagen-sandwich kultiviert wurden, wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen samt Kollagen mittels Zellschaber gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dreimal zentrifugiert (5400 rcf, 3', 4 °C) und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend wurde das in dem restlichen Kollagen eingebettete Zellpellet in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert.

Die Homogenisierung aller Proben erfolgte den Herstellerangaben entsprechend mit dem QIAshredder Kit (Qiagen, Hilden). Die weitere Isolierung der RNA entsprach den Herstellerangaben des RNeasy Mini Kits, wobei die Proben für das RT² Profiler Gene Array zusätzlich mit DNase (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben behandelt wurden.

Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration der präparierten RNA erfolgte mittels Messung am Nano-Drop (NanoDrop Technol., Wilmington, USA) spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm/280 nm.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von jeweils 1 µg RNA pro Versuchsprobe erfolgte mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die so gewonnene cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:6 in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und somit auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt für die Anwendung in der RT-PCR Expressionsanalyse. Die Reinheit der Synthesereaktion wurde durch Kontrollen ohne RNA- oder Enzymzugabe überprüft.

Die reverse Transkription von jeweils 1 µg RNA pro Versuchsprobe für den Einsatz im RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Hilden) wurde mit Hilfe des RT² First Strand Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.3 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ermöglicht neben der Anwendung als Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren ebenso die quantitative Erfassung der gebildeten DNA-Produkte während der Synthesereaktion. Die Quantifizierung wird durch den Einsatz von Fluoreszenz-Farbstoffen ermöglicht (z.B. SYBR Green, Extinktion bei 494 nm, Emission bei 521 nm), die an die DNA binden und bei jedem Zyklus gemessen werden. Dabei korreliert die Zunahme der Fluoreszenz mit der Zunahme der gebildeten PCR-Produkte. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt zu Beginn der exponentiellen Phase und wird mit dem C_T -Wert angegeben. Der C_T -Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Zur Normalisierung des C_T -Wertes des Zieltranskripts wird der C_T -Wert eines stabil unter möglichst allen Bedingungen exprimierten Referenztranskripts (*housekeeping gene*) bestimmt und die Differenz der beide wird gebildet (ΔC_T -Wert, Lang und Heeg 1998). Die Messung wurde am ViiA7 RT-PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) in 96-Loch-Mikrotiter-Platten unter der Verwendung der entsprechenden Oligonukleotid-Primer (siehe Abschnitt 2.1.5) durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 1,2 μ l cDNA (10 ng/ μ l), 12,5 μ l SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt), 9,3 μ l Nuklease-freies H₂O und je 1 μ l des entsprechenden *sense*- und *antisense*-Primers (10 pmol/ μ l) als Gesamtvolumen von 25 μ l eingesetzt. Das PCR-Reaktionsprogramm setzte sich standardmäßig aus einem einmaligen Schritt von 2 Minuten bei 50 °C, einer initialen Denaturierung von 10 Minuten bei 95 °C, 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung) und 1 Minute bei 60 °C (*Annealing* und *Elongation*) zusammen. Zur Qualitätssicherung schloss sich an jeden Lauf ein Kurzprogramm zur Analyse der Schmelzkurve an (15 Sekunden bei 95 °C, 1 Minute bei 60 °C, 15 Sekunden bei 95 °C). Die RT-PCR Programmeinstellungen für die Messungen der 96-Loch-Mikrotiterplatten des *RT² Profiler PCR Array* (Qiagen, Hilden) wurden manuell eingegeben. Das Programm differierte in der Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs (1 °C/s) und dem Fehlen des ersten Schritts des Standardprogramms (2 Minuten bei 50 °C).

2.2.4 Verwendete PC-Programme und Online-Tools

- Servier Medical Art (SERVIER INTERNATIONAL, Suresnes, Frankreich)
- Citavi (Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz)
- Graph Pad Prism Quick Cals (GraphPad Software, La Jolla, USA)
- ImageJ (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA)
- ViAA7 Software (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- MS Office 2010 (Microsoft, Redmond, USA)

2.2.5 Statistische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der aus der *dot-blot*-Methode des Proteom Profiler Arrays erhaltenen Signale wurde mit Hilfe der ImageJ Software (Wayne Rasband, NIH; USA) durchgeführt. Die Werte wurden relativ zur Kontrolle berechnet. Tabellarisch oder in Diagrammen dargestellte Daten wurden als Mittelwert \pm S.D. (Standardabweichung) ausgedrückt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Graph Pad Quick Cals (La Jolla, USA) unter Verwendung des t-tests. Die Ergebnisse wurden als signifikant eingestuft bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Einflussfaktoren der FXR-vermittelten BSEP Transkription

3.1.1 Die CDCA-bedingte BSEP Genexpression wird durch die nicht zytotoxisch wirkende Konzentration von 50 μM maximal induziert

Die Basis der in dieser Arbeit untersuchten Einflüsse von Zytokinen und Chemokinen auf die transkriptionelle Expression des Gallensalztransporters BSEP bildet die Aktivierung des nukleären Rezeptors und Transkriptionsfaktors FXR. Die Aktivierung erfolgt durch die Stimulation mit der Gallensäure CDCA. Dies wurde in Zellkultur-basierenden Versuchen an präparierten primären murinen Hepatozyten (PMHs) oder an der die Zellpolarität aufrechterhaltenden humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG durchgeführt. Da CDCA potentiell zelltoxisch wirken kann, wurde anhand eines kolorimetrischen Tests ermittelt, ob das für die weiterführenden Experimente verwendete Konzentrationspektrum diese Wirkung aufweist. Der photometrisch messbare Abfall der Formazanbildung entspricht der Abnahme der Zellviabilität (Abbildung 5).

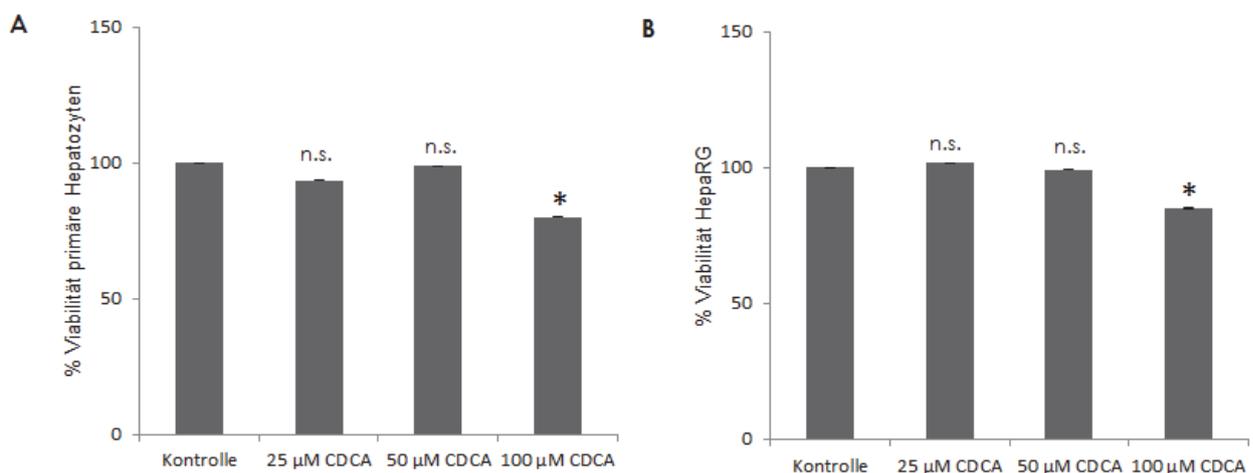


Abbildung 5 Einfluss von CDCA auf die Zellviabilität von primären murinen Hepatozyten und HepaRG Zellen

Zur Untersuchung des konzentrationsabhängigen Einflusses von CDCA (25, 50 und 100 μM) wurden Stimulationsversuche mit primären murinen Hepatozyten (**A**) und Zellen der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG (**B**) über acht Stunden durchgeführt. Die kolorimetrische Detektion der Formazanbildung stimulierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wurde bestimmt und diente als Basis der prozentualen Erfassung. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde durch den t-Test ermittelt ($p < 0,05$).

Die aus diesem Versuch gewonnenen Ergebnisse belegen, dass übergeordnet nur leichtgradige Unterschiede der Zellviabilität bei den verschiedenen verwendeten CDCA Konzentrationen aufgetreten sind. Bis zu einer Konzentration von 50 μM ist kein signifikanter und messbarer zelltoxischer Einfluss durch CDCA entstanden. Ab einer Konzentration von 100 μM wird sowohl bei PMHs als auch bei der Zelllinie HepaRG eine leichtgradige, aber signifikante Beeinträchtigung der Zellviabilität ausgelöst. Dies hat auch Auswirkungen auf die in Abhängigkeit von der Gallensäurenkonzentration akkumulierten BSEP Transkripte. CDCA induziert bis zu einer Konzentration von 50 μM die BSEP Transkription maximal. Stimulationsversuche mit einer CDCA Konzentration von 100 μM führen zu einem signifikanten Abfall der Transkriprate (Abbildung 6). Auf Basis der genannten Ergebnisse wurde eine Konzentration von 50 μM für alle weiteren Stimulationsversuche mit CDCA festgelegt.

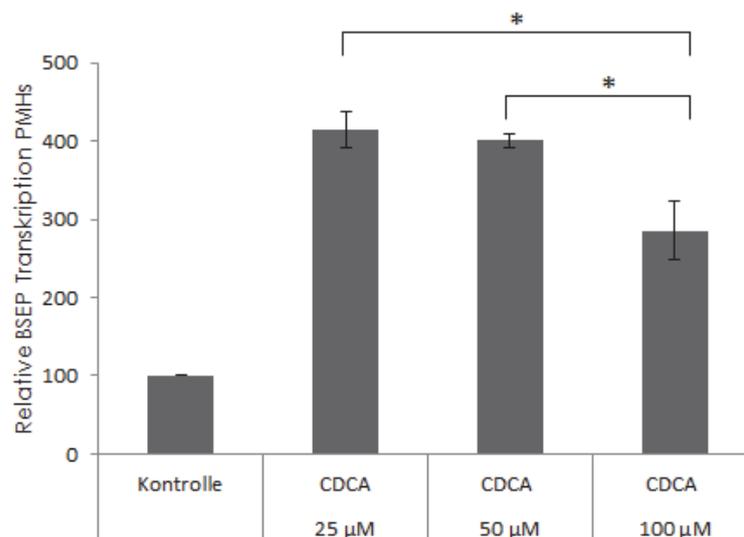


Abbildung 6 Stimulation mit 50 μM CDCA führt zu einer maximalen BSEP Transkript Akkumulation in PMHs Zur Untersuchung des konzentrationsabhängigen Einflusses von CDCA auf die Transkription der BSEP mRNA wurden Stimulationsversuche mit PMHs über acht Stunden durchgeführt. Dazu wurden Stimulationsreihen mit drei verschiedenen Konzentration CDCA (25, 50 und 100 μM) durchgeführt. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die ΔCT -Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

3.1.2 CDCA-Stimulation über acht Stunden führt zu maximaler BSEP Transkription

Ein weiterer interessanter Parameter bei Stimulationsversuchen ist neben der Applikation der adäquaten Konzentration der Agenzien ebenso die sinnvolle Determinierung der Stimulationsdauer. Um die optimale Stimulationsdauer bestimmen zu können, wurden Zeitreihen über drei Zeitpunkte bis zu einer maximalen Stimulationsdauer von 24 Stunden erstellt (Abbildung 7). Die hier dargestellten Ergebnisse belegen, dass über die Stimulationsdauer von acht Stunden hinaus keine Optimierung der maximalen BSEP Transkript Akkumulation über den Faktor Zeit zu erreichen ist, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei dargestellten Stimulationsendpunkten gibt. Für alle weiterführenden Experimente wurde daher die optimale Stimulationsdauer auf acht Stunden festgelegt.

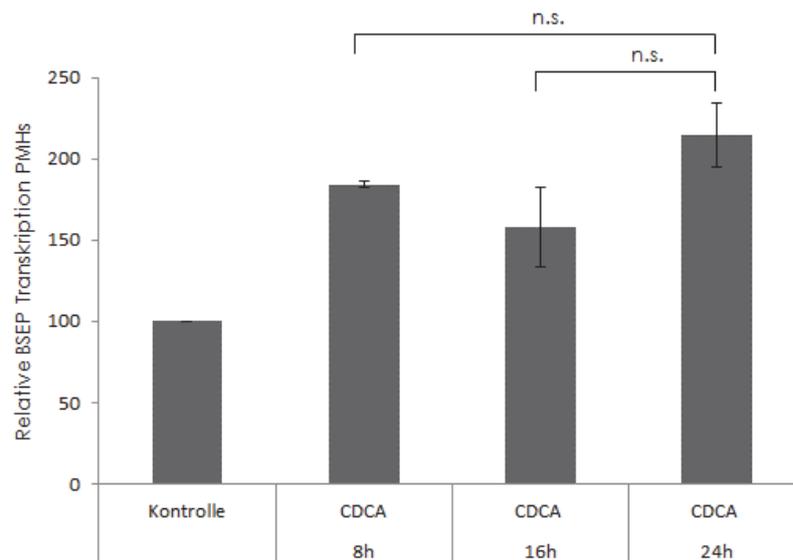


Abbildung 7 CDCA-Stimulation über acht Stunden hinaus führt zu keinem signifikanten Unterschied der maximalen BSEP Transkription in PMHs Zur Bestimmung der adäquaten Zeitspanne der CDCA-Stimulation zur Aktivierung der BSEP Genexpression wurden Zeitreihen mit 50 μ M CDCA Applikation an PMHs mit drei verschiedenen Stimulationsendpunkten (8, 16 und 24 Stunden) durchgeführt. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

3.1.3 Die über CDCA induzierbare BSEP Genexpression ist abhängig von FXR

Nach gegenwärtigem Stand der Literatur wird die CDCA-induzierte, transkriptionelle Expression von BSEP wesentlich über den Transkriptionsfaktor FXR kontrolliert (Suchy *et al.* 2006). Um die FXR-Abhängigkeit der Expression des BSEP Gens im gewählten Setting zu belegen, wurden PMHs aus FXR-deletierten Tieren isoliert und die CDCA-induzierte Expression des BSEP Gens im Vergleich zu Kontrolltieren untersucht (Abbildung 8).

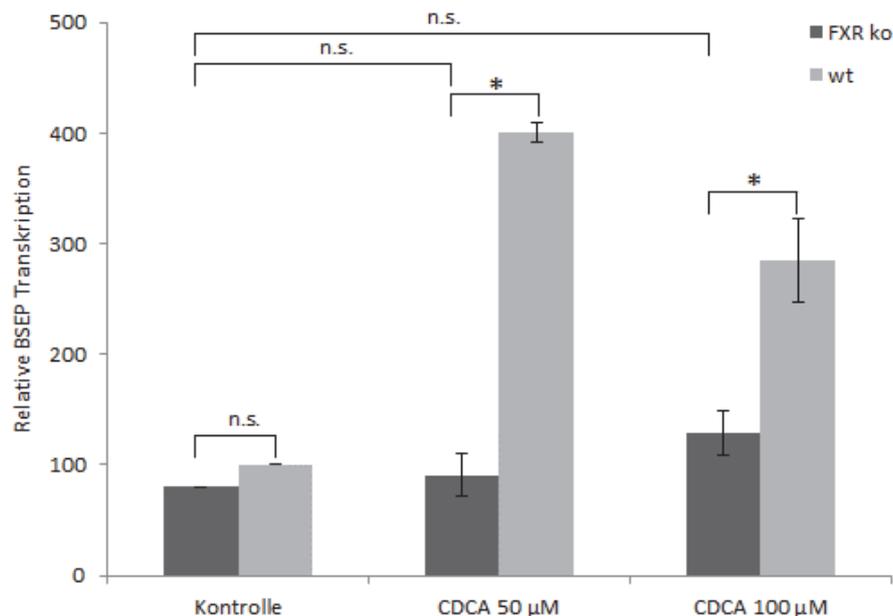


Abbildung 8 Der Einfluss der CDCA Stimulation auf die BSEP Transkription von Wildtyp- und FXR-defizienten PMHs Zum Ausschluss eines CDCA-induzierten Effekts auf die Aktivierung der BSEP Genexpression unabhängig vom Transkriptionsfaktor FXR, wurden FXR^{-/-} und Wildtyp PMHs mit 50 bzw. 100 µM CDCA über einen Zeitraum von acht Stunden stimuliert. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse belegen, dass nach Deletion des Gens und Fehlen des entsprechenden Genprodukts, eine Stimulation mit CDCA keinen signifikanten Effekt auf die BSEP Transkription im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollversuchsgruppe aufweist. Dies wird vor allem im Vergleich zu den Ergebnissen der Wildtyp-PMHs deutlich. CDCA vermag als Gallensäure die Signaltransduktion auch unabhängig von FXR zu induzieren, aber die CDCA-vermittelte Aktivierung der BSEP Genexpression findet spezifisch über FXR als Transkriptionsfaktor statt.

3.1.4 Dexamethason fördert die CDCA-induzierte BSEP Genexpression

Die Zusammensetzung von Nährmedien kann einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Genen haben. Die Nährmedien zur Kultivierung primärer Hepatozyten oder bestimmter hepatozytärer Zelllinien werden üblicherweise mit Glukokortikoiden versetzt. So wird für PMHs 100 nM Dexamethason und für die Hepatoma-Zelllinie 500 nM Hydrocortison-Hemisuccinat verwendet. Der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Genexpression von hepatozellulären Transportproteinen, im Besonderen auf BSEP, wird experimentell *in vivo* und *in vitro* in der Literatur eher kontrovers diskutiert (Warskulat *et al.* 1999; Turncliff *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2007; Liu *et al.* 2008; Rosales *et al.* 2013). Zur Klärung des Effekts von Glukokortikoiden auf die BSEP Genexpression in dem hier gewählten Setting, wurden Stimulationsversuche mit PMHs in Kultivierungsmedium mit und ohne Dexamethason durchgeführt und die BSEP Transkript Akkumulation bestimmt (Abbildung 9).

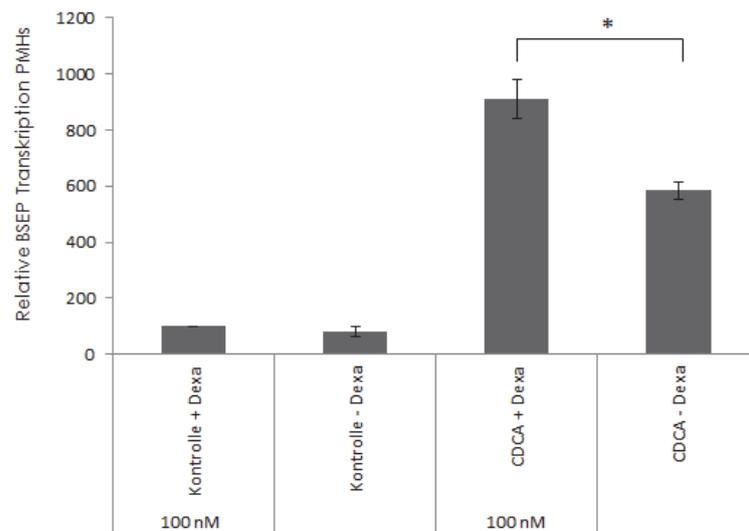


Abbildung 9 Dexamethason im Nährmedium fördert die BSEP Transkript Akkumulation Zur Untersuchung des Einflusses des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason als Zusatz des Nährmediums in einer Konzentration von 100 nM auf die BSEP Genexpression in murinen PMHs, wurden Stimulationsversuche mit 50 μ M CDCA über einen Zeitraum von acht Stunden durchgeführt. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass der in Nährmedien für PMHs übliche Zusatz von 100 nM Dexamethason zu einer signifikanten Verstärkung der CDCA-induzierten BSEP Expression führt. Für alle weiteren Versuche wurde Dexamethason-, bzw. Hydrocortison-Hemisuccinat-haltiges Nährmedium zur *in vitro* Kultivierung verwendet.

3.1.5 Der Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription

Eine häufige Ursache für das Auftreten einer cholestatischen Beeinträchtigung der normalen Leberfunktion stellt die Freisetzung von Entzündungsmediatoren dar. Zytokine sind zu einem großen Teil mitverantwortlich für die Induktion einer Cholestase. Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β , welche NF- κ B-abhängig bei einer Sepsis-induzierten Cholestase als Antwort auf einen Inflammationsreiz freigesetzt werden, regulieren im Rahmen von Entzündungs-assoziierten Lebererkrankungen die Expression wichtiger Transportproteine in der Leberzelle. So auch die BSEP Expression (Hartmann *et al.* 2002; Elferink, Marieke *et al.* 2004; Donner *et al.* 2007; Diao *et al.* 2010). Da in dieser Arbeit die Mechanismen untersucht werden sollten, über die IL-1 β die CDCA-induzierte Heraufregulation der Expression des BSEP Gens hemmt, wurde vornehmlich der Einfluss des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β auf die Transkription des Gallensalztransporters BSEP untersucht. Allerdings konnte ebenso der in der Literatur beschriebene negative Einfluss von TNF α auf die CDCA-induzierten BSEP Genexpression *in vitro* nachgewiesen werden (Abbildung 10). TNF α übt schon bei einer Konzentration von 1 ng/ml einen signifikant hemmenden Effekt auf die CDCA-induzierte Expression des BSEP Gens aus. Dieser Effekt ließ sich durch eine Erhöhung der TNF α Konzentration nicht weiter steigern.

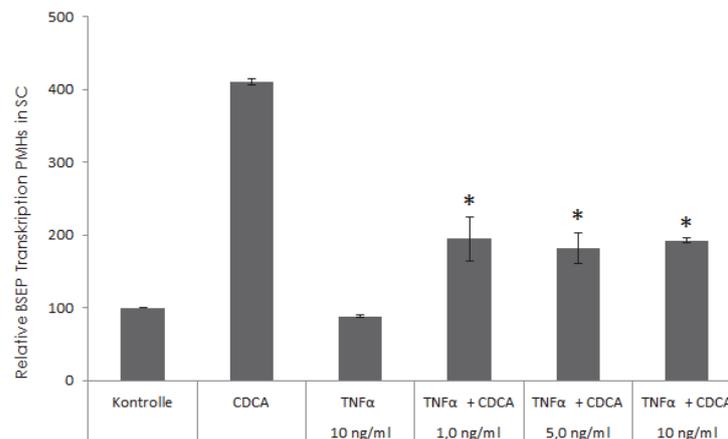


Abbildung 10 TNF α hemmt die CDCA-induzierte BSEP Transkription von PMHs in SC Murine PMHs wurden in einer Kollagenmatrix als SC kultiviert und mit drei verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem murinem TNF α (1, 5 und 10 ng/ml) eine Stunde präinkubiert, bevor die Zellen mit 50 μ M CDCA über einen Zeitraum von acht Stunden stimuliert wurden. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA oder 10 ng/ml TNF α diente, zusammen mit unstimulierten Proben, als Kontrollen. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Für diesen und auch für die Schlüsselexperimente folgender Versuchsreihen wurden die PMHs in eine 3D-Kollagenmatrix eingebettet und kultiviert, der sogenannten *sandwich-Kultur* (SC). Der Vorteil dieser Kultivierungsmethode ist der längerfristige Erhalt der Zellpolarität. Dies ist wichtig für die Expressionsregulation von Transportproteinen wie BSEP. Bei der üblichen Methode der *Monolayer-Kultur* (ML) dedifferenzieren die Hepatozyten *in vitro* sehr rasch und verlieren ihre polygonale Zellform in einem Prozess der auch als Epithel-zu-Mesenchym-Transition (EMT) bezeichnet wird. Die *sandwich-Kultur* kann diesen Prozess nicht ganz aufhalten, aber dagegenwirken und ihn verzögern (Godoy *et al.* 2010) (Abbildung 11).

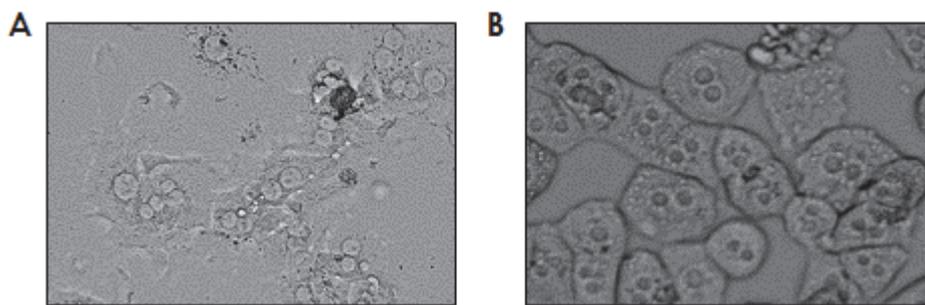


Abbildung 11 Visueller Vergleich der Kultivierung von PMHs in ML und SC Nach der Präparation von PMHs aus der Leber wurden diese entweder nur mit einer Kollagen-Beschichtung als ML-Kultur (**A**) oder eingebettet in eine 3D-Kollagenschicht als SC (**B**) kultiviert. Deutlich ist in der SC die polygonale und physiologische Zellmorphologie der PMHs zu erkennen (**B**), im Gegensatz zur ML-Kultur (**A**). Dargestellt sind die Aufnahmen von 100x mikroskopischen Vergrößerungen einen Tag nach der Präparation (D1).

Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass die Kultivierung ohne 3D-Kollagenmatrix eine schnellere Dedifferenzierung und EMT der PMHs zur Folge hat (11A). Im Gegensatz dazu steht die physiologisch und polygonal erscheinende Zellmorphologie der Hepatozyten, die in SC kultiviert wurden (11B).

3.1.6 IL-1 β hemmt ab 0,1 ng/ml signifikant die CDCA-bedingte Aktivierung der BSEP Genexpression

Für die Untersuchung des Einflusses von IL-1 β auf die Entstehung einer Cholestase wurden in dieser Arbeit eingehende *in vitro* Studien zum konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss von IL-1 β auf die transkriptionelle Regulation der BSEP Expression durch CDCA untersucht. Vorversuche und erste Studien wurden an PMHs vorgenommen, die in *monolayer*-Kulturen kultiviert wurden. Des Weiteren wurden Schlüsselexperimente zusätzlich an PMHs in *sandwich*-Kultur durchgeführt, da so durch die Einbettung der Hepatozyten in eine Kollagenmatrix die zelluläre Reaktion unter Aufrechterhaltung der Zellpolarität untersucht werden konnte. Über die Versuche an PMHs hinaus, konnten ebenfalls einige Experimente an Zellen der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG durchgeführt werden. Diese Zelllinie zeigt noch ein stark an primäre humane Hepatozyten erinnerndes Genexpressionsprofil, besonders im Bereich der Transporterexpression, so dass eine Übertragung der Experimente auf eine humane Ebene stattfinden konnte. PMHs und HepaRG Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen IL-1 β präinkubiert und anschließend mit CDCA stimuliert (Abbildung 12). Schon geringe Konzentrationen IL-1 β sorgen für eine signifikante Hemmung der CDCA-bedingten BSEP Expression der PMHs und HepaRG Zellen. Die in diesem Versuchsansatz gewählten Konzentrationen von 0,5 ng/ml (PMHs) bzw. 1 ng/ml IL-1 β (HepaRG) hemmen maximal die Aktivierung des BSEP Gens durch CDCA.

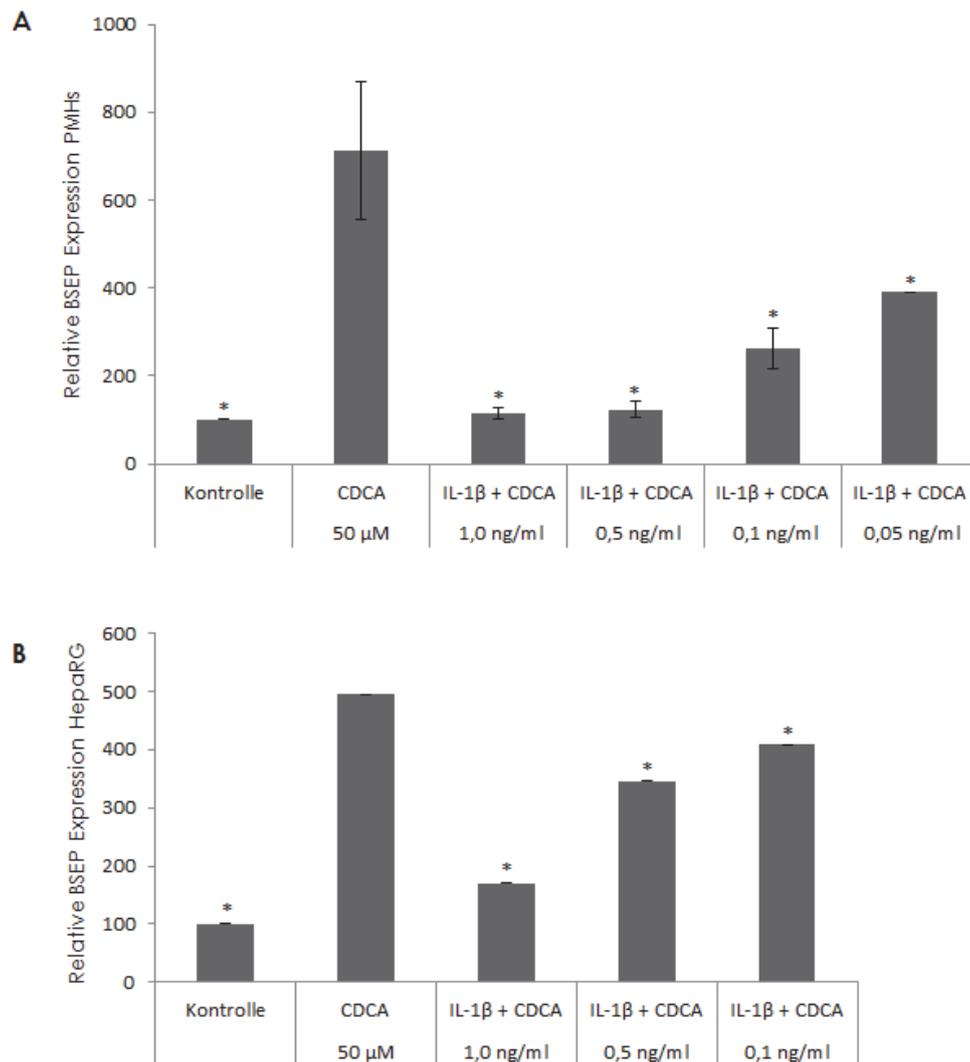


Abbildung 12 Der konzentrationsabhängige Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von PMHs und der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG Murine PMHs (**A**) und die humane Hepatoma-Zelllinie HepaRG (**B**) wurden mit drei (**B**) bzw. vier (**A**) verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem murinem (**A**) bzw. humanem (**B**) IL-1 β (0,05, 0,1, 0,5 und 1,0 ng/ml) eine Stunde präinkubiert, bevor die Zellen mit 50 μ M CDCA über einen Zeitraum von acht Stunden stimuliert wurden. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Um den Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Genexpression unter optimalen zellulär-regulatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Schlüsselexperimente zum konzentrationsabhängigen Einfluss von IL-1 β ebenfalls an in SC kultivierten PMHs durchgeführt. Die obere Grenze der IL-1 β Konzentration wurde in dieser Versuchsreihe höher gesetzt als in den in Abbildung 12 dargestellten Versuchen, da eingeplant wurde, dass die SC 3D-Kollagenmatrix eine mögliche Diffusionsbarriere für die Entfaltung der IL-1 β Wirkung darstellt (Abbildung 13).

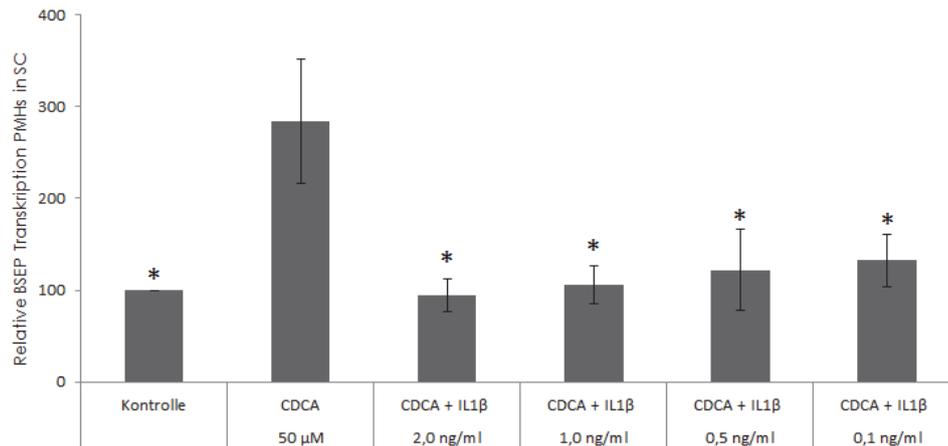


Abbildung 13 Der konzentrationsabhängige Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von PMHs in SC PMHs, kultiviert in einer 3D-Kollagenmatrix, wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem murinem IL-1 β (0,1, 0,5, 1,0 und 2,0 ng/ml) eine Stunde präinkubiert, bevor die Zellen mit 50 μ M CDCA über einen Zeitraum von acht Stunden stimuliert wurden. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse belegen, dass IL-1 β in allen untersuchten Konzentrationen einen signifikant hemmenden Effekt auf die CDCA-vermittelte BSEP Genexpression aufweist. Die Kollagenmatrix stellte keine Diffusionsbarriere für den IL-1 β -Effekt dar, so dass für weiterführende Versuche eine Konzentration von 0,1 ng/ml zur Effektauslösung gewählt wurde.

3.1.7 IL-1 β inhibiert bis zu zwei Stunden nach CDCA-Stimulation noch effektiv die Genexpression von BSEP

Zur Untersuchung des zeitabhängigen Einflusses von IL-1 β auf die CDCA-bedingte Heraufregulation des BSEP Gens, wurden PMHs in SC kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während oder nach der Stimulation mit CDCA mit IL-1 β behandelt (Abbildung 14). Der signifikant hemmende Effekt von IL-1 β konnte noch bis zu einer Applikationsdauer von zwei Stunden nach CDCA-Stimulation nachgewiesen werden.

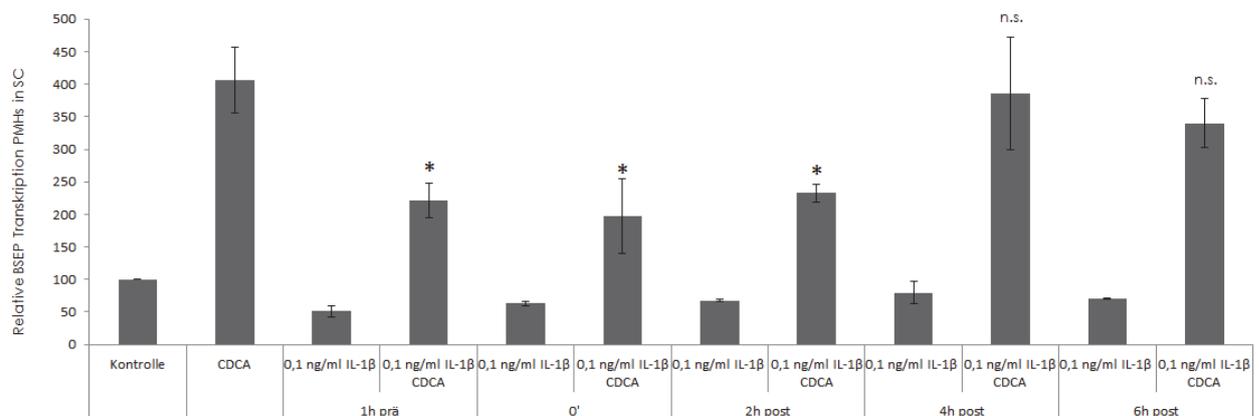


Abbildung 14 Einfluss der zeitabhängigen Applikation von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription von PMHs in SC Zur Untersuchung der zeitabhängigen transkriptionellen Hemmung der CDCA-induzierten BSEP Expression von PMHs in SC durch IL-1 β wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 0,1 ng/ml IL-1 β behandelt und mit 50 μ M CDCA über acht Stunden stimuliert. Die IL-1 β Applikation wurde entweder eine Stunde vor CDCA-Stimulation, simultan oder zwei, vier bzw. sechs Stunden nach Stimulation mit CDCA durchgeführt. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde durch den t-Test ermittelt ($p < 0,05$).

3.1.8 Der inhibitorische Effekt von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkript Akkumulation wird durch den Rezeptor IL1R1 vermittelt

Die IL-1 β -induzierte Signaltransduktion wird durch den Rezeptor IL1R1 vermittelt (Weber *et al.* 2010). Zur Sicherstellung, dass dieser Signalweg ursächlich ist für den hemmenden Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-bedingte BSEP Genexpression, wurden entsprechende Versuche mit PMHs durchgeführt, denen das kodierende Gen für diesen Rezeptor durch genetische Manipulation entfernt wurde (Abbildung 15).

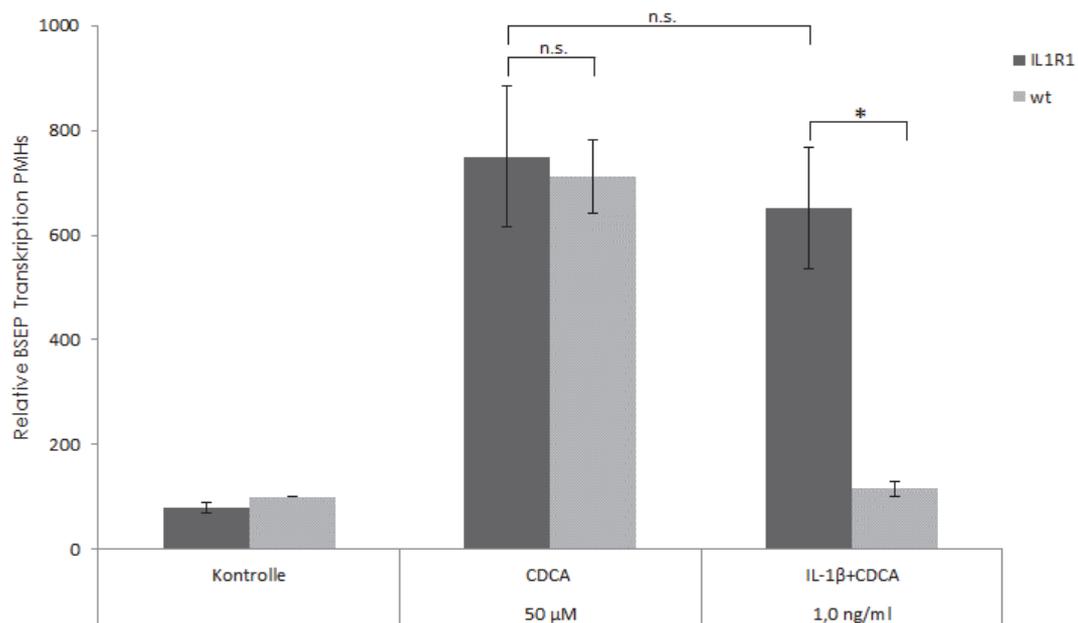


Abbildung 15 Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte Aktivierung des BSEP Gens von IL1R1^{-/-} PMHs Zur Untersuchung der spezifischen Wirkung von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden IL1R1-defiziente primäre murine Hepatozyten mit 1,0 ng/ml IL-1 β eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 50 μ M CDCA für acht Stunden stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass für den hemmenden Effekt von IL-1 β auf die CDCA-induzierte Expression des BSEP Gens der Rezeptor IL1R1 zwingend notwendig ist. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit CDCA stimulierten PMHs und den mit IL-1 β behandelten und CDCA stimulierten PMHs nachgewiesen werden, wie es im Vergleich mit Wildtyp-Hepatozyten der Fall war. Es zeigte sich für das gewählte Setting ein direkter Einfluss zwischen der Abhängigkeit der effektiven bzw. inhibitorischen Signaltransduktion von IL-1 β und dem Vorhandensein des spezifischen Rezeptors.

Des Weiteren wurde in Versuchen an FXR-deletierten primären murinen Hepatozyten ebenfalls der Effekt von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP Expression untersucht. Dass die durch CDCA-induzierte Aktivierung des BSEP Gens spezifisch und FXR-abhängig ist, wurde in Abbildung 8 bereits dargestellt. In diesem Versuchsaufbau sollte nun untersucht werden, ob IL-1 β einen andersartigen Effekt bei der Deletion von FXR aufweist. Dazu wurden FXR^{-/-} PMHs mit IL-1 β präinkubiert und mit CDCA stimuliert (Abbildung 16). Es zeigte sich ein Abhängigkeitsverhältnis zwischen dem inhibitorischen Effekt von IL-1 β und der FXR-abhängigen und CDCA-bedingten Aktivierung des BSEP Gens. Es konnte bei den mit CDCA stimulierten und FXR-defizienten PMHs kein signifikanter Unterschied der BSEP Expression nach der Applikation von IL-1 β gemessen werden.

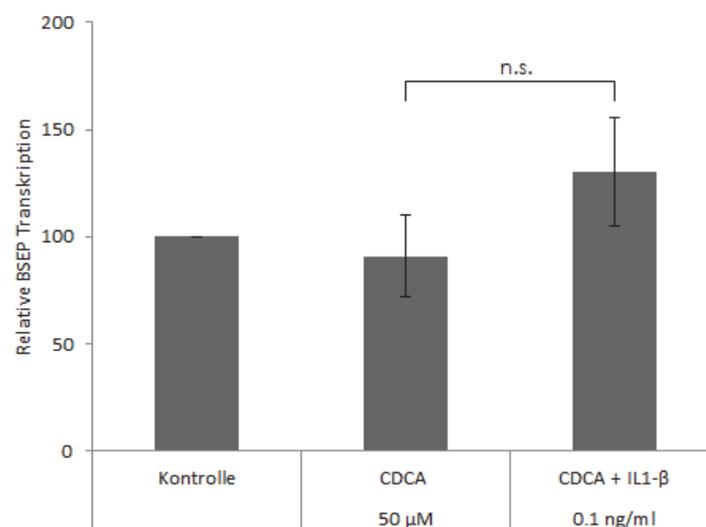


Abbildung 16 Einfluss von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von FXR^{-/-} PMHs Zur Untersuchung der spezifischen Wirkung von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden FXR-defiziente primäre murine Hepatozyten mit 0,1 ng/ml IL-1 β eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 50 µM CDCA für acht Stunden stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 µM CDCA diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

3.2 IL-1 β erhöht den intrazellulären cAMP-Spiegel

Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion kontrolliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Gentranskription, Zellmetabolismus und Proliferation. cAMP spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Vermittlung extrazellulärer Stimuli durch definierte Zeit-, Konzentrations- und Kompartimentierungsparameter (Zaccolo 2011). Verschiedene extrazelluläre Stimuli können als Auslöser für den Anstoß der cAMP-vermittelten Signalkaskade dienen, so auch inflammatorische Stimuli. Vorversuche zu einer Inhibitor-basierten Klärung der intrazellulären IL-1 β Signalweiterleitung über den dafür bekannten NF- κ B-Signalweg konnten im Kontext der IL-1 β -vermittelten Hemmung der CDCA-induzierten BSEP Genexpression keinen Einfluss nachweisen (Ergebnisse nicht dargestellt). Um eine mögliche intrazelluläre Signalweiterleitung des IL-1 β -Effekts durch cAMP als *second messenger* zu untersuchen, wurden PMHs mit IL-1 β präinkubiert und mit CDCA stimuliert. Anschließend wurde mit Hilfe eines cAMP Immuno-Assays die intrazelluläre cAMP-Konzentration bestimmt (Abbildung 17).

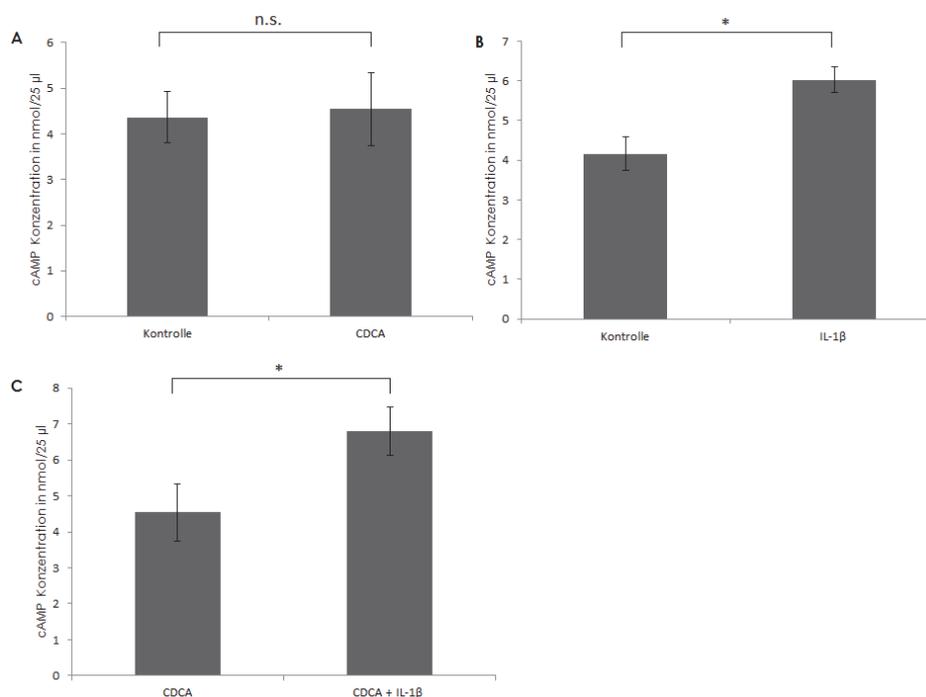


Abbildung 17 Der Einfluss von CDCA und IL-1 β auf den intrazellulären cAMP-Spiegel von PMHs PMHs wurden in einer 96-Loch Platte kultiviert und mit 500 μ M IBMX 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten lang mit 50 μ M CDCA (A), 1.0 ng/ml IL-1 β (B) oder der Kombination aus beiden Agenzien (C) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden 25 μ l/Probe auf die Messplatte übertragen und nach Herstellerangaben weiterbehandelt. Die Messung am Luminometer wurde bei 425 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 1s/Loch durchgeführt. Die Auswertung der gemessenen RLU's wurde unter Bezugnahme der Messwerte der durchgeführten cAMP-Standardreihe mittels des Statistikprogramms GraphPad Prism durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von fünf unabhängigen Experimenten berechnet und die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Wie in Abbildung 17 dargestellt, führt IL-1 β zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels (B), während CDCA keinen signifikanten Einfluss aufweist (A). In der Kombinationsgabe wird der positive Effekt von IL-1 β im Vergleich zu den nur mit CDCA behandelten Proben ebenfalls deutlich (C).

3.3 cAMP hemmt die CDCA-bedingte Aktivierung des BSEP Gens

Die vorangegangenen Ergebnisse belegen, dass IL-1 β einen positiven Einfluss auf den intrazellulären cAMP-Spiegel hat. Um zu untersuchen, ob ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration auch zu einer Hemmung der CDCA-induzierten Expression von BSEP führt, wurde der Einfluss von synthetischem cAMP, Phosphodiesterase (PDE) Inhibitoren und Aktivatoren der Adenylylzyklasen (ACs) untersucht. PMHs wurden mit IBMX behandelt und anschließend mit CDCA stimuliert (Abbildung 18). IBMX ist ein dem Koffein ähnliches Xanthin-Derivat, das als nicht-spezifischer Inhibitor der cAMP und cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) PDEs fungiert. Die Inhibition der PDEs führt zu einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel. Das Ergebnis belegt, dass es zu einer signifikanten Hemmung der CDCA-vermittelten BSEP Genexpression, durch Hemmung der PDEs und Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels, kommt.

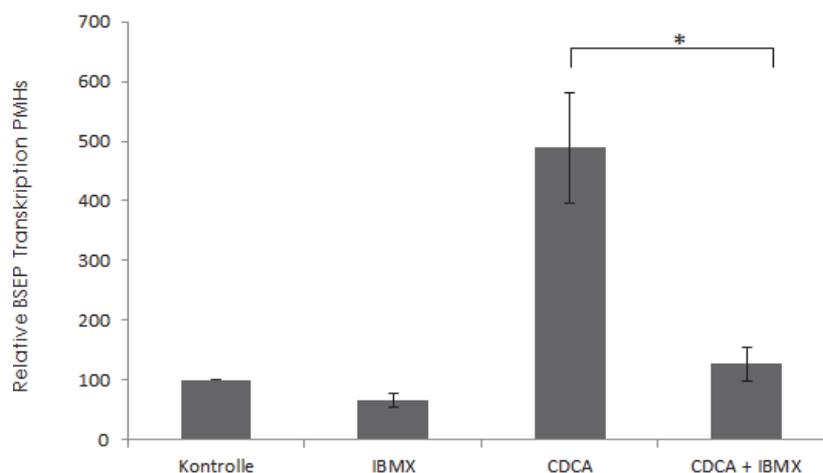


Abbildung 18 IBMX hemmt die CDCA-vermittelte BSEP Transkription in PMHs Zur Untersuchung der Wirkung von IBMX auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden primäre murine Hepatozyten mit 500 μ M IBMX 30 Minuten präinkubiert und anschließend mit 50 μ M CDCA für acht Stunden stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA und 500 μ M IBMX diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss von cAMP auf die zelluläre Signaltransduktion zu untersuchen, ist die Behandlung mit synthetischen cAMP-Analoga. 8-Bromo-cAMP ist ein bioaktives, Zellmembran-permeables Analogon, das durch seine Komposition eine größere Hydrolyse-Resistenz gegen den Abbau durch PDEs aufweist. PMHs wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen 8-Bromo-cAMP präinkubiert und anschließend mit CDCA inkubiert (Abbildung 19).

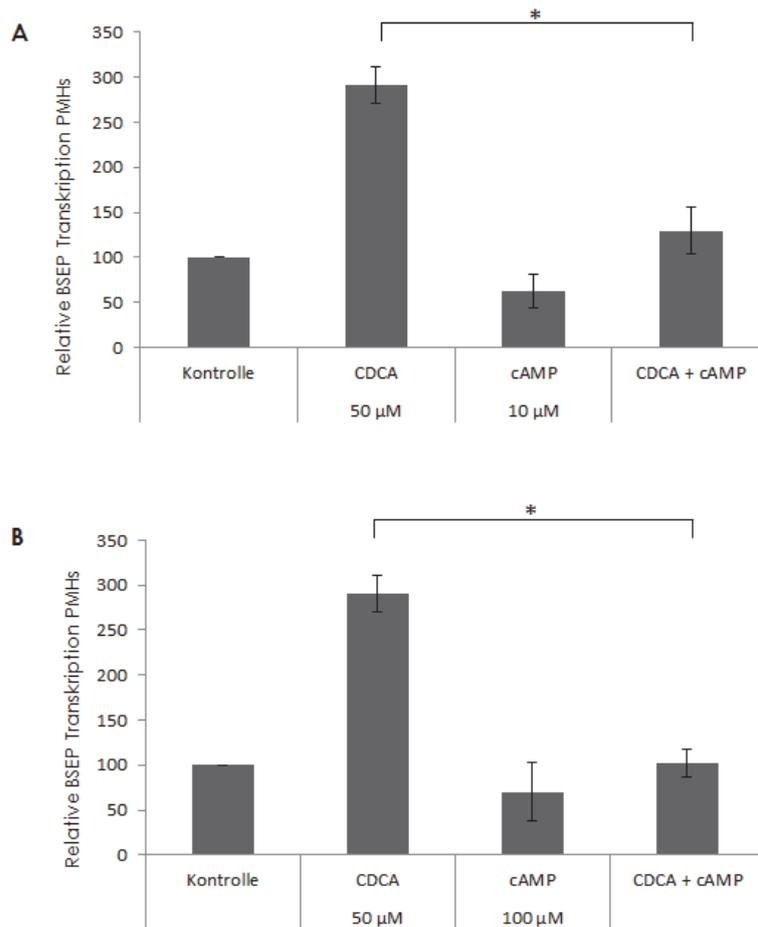


Abbildung 19 Der konzentrationsabhängige Einfluss der Präinkubation von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription von PMHs Zur Untersuchung der Wirkung von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden primäre murine Hepatozyten mit 10 μM **(A)** bzw. 100 μM **(B)** 8-Bromo-cAMP eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 50 μM CDCA für acht Stunden stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 μM CDCA und 10 μM 8-Bromo-cAMP diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, welche auf unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Signifikanz (*) wurde durch den t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Die in Abbildung 19 dargestellten Ergebnisse belegen den signifikanten Einfluss von cAMP auf die transkriptionelle Regulation der CDCA-vermittelten BSEP Expression. Auch bei simultaner Applikation von 8-Bromo-cAMP zusammen mit dem transkriptionellen Aktivator CDCA wird die BSEP Genexpression signifikant inhibiert (Abbildung 20).

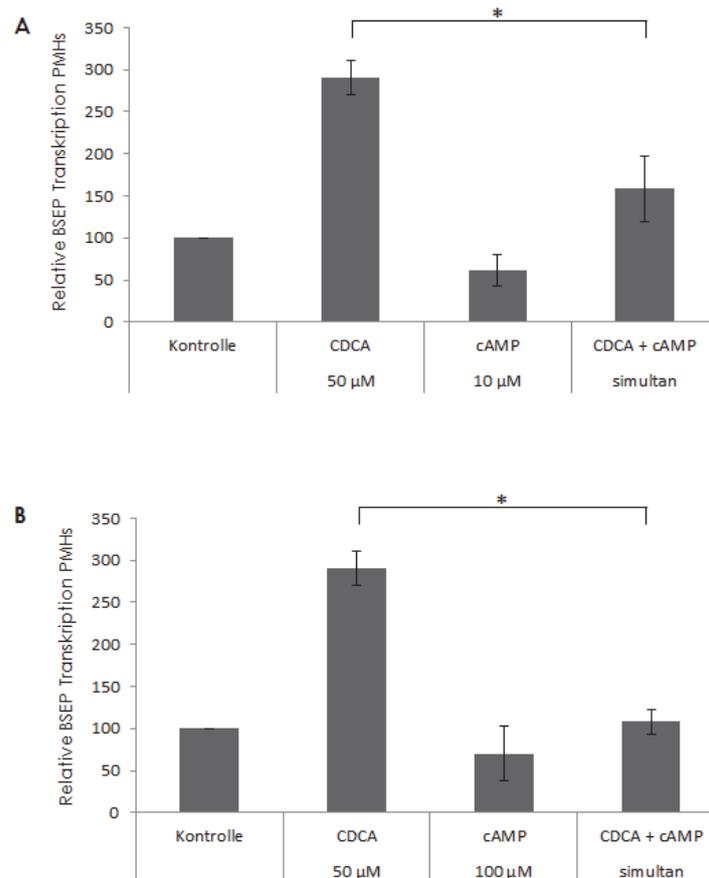


Abbildung 20 Der Einfluss der simultanen Applikation von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription von PMHs Zur Untersuchung der Wirkung von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden primäre murine Hepatozyten mit 10 μM **(A)** bzw. 100 μM **(B)** 8-Bromo-cAMP simultan mit 50 μM CDCA für acht Stunden stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 μM CDCA und 10 μM 8-Bromo-cAMP diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, welche auf unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Zur weiterführenden Untersuchung des Einflusses der cAMP-Signaltransduktion auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription wurden PMHs in SC und ML-Kultur sowie die humane Hepatoma-Zelllinie HepaRG mit Forskolin behandelt und anschließend mit CDCA stimuliert (Abbildung 21). Forskolin ist ein in *Plectranthus barbatus* vorkommendes Diterpen, das eine stimulierende Wirkung auf die Klasse der Adenylzyklen aufweist (Alasbahi *et al.* 2010). Als Folge der Enzymaktivierung wird in der Zelle die Konversion von ATP zu cAMP katalysiert. Forskolin zeigt einen signifikant hemmenden Einfluss auf die Aktivierung der CDCA-bedingten Transkription des Gallensalztransporters BSEP.

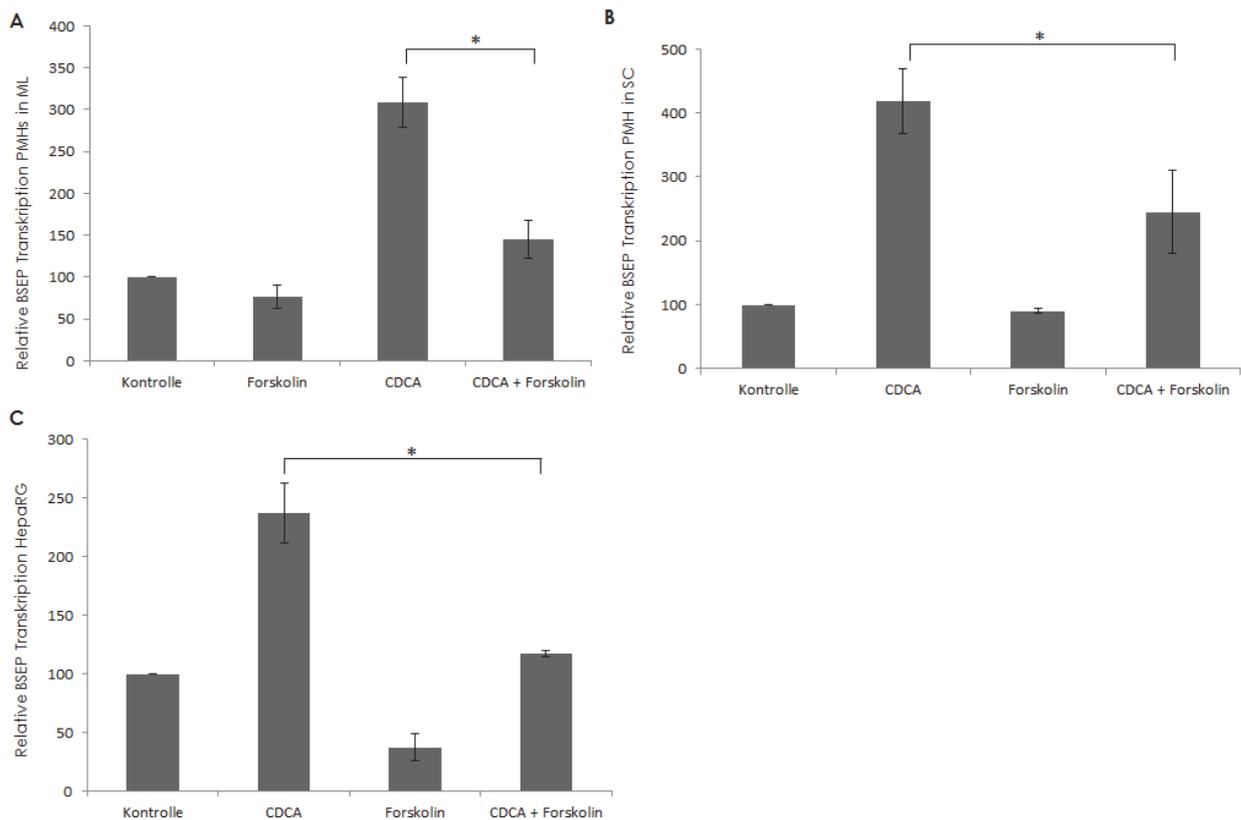


Abbildung 21 Forskolin hemmt die CDCA-vermittelte BSEP Transkription in PMHs in SC und ML-Kultur sowie in der Zelllinie HepaRG. Zur Untersuchung der Wirkung von Forskolin auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden PMHs in ML-Kultur (**A**), SC (**B**) sowie die Zelllinie HepaRG (**C**) mit 10 μ M Forskolin eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 50 μ M CDCA für acht Stunden stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA und 10 μ M Forskolin diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA bzw. HPRT1 als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Signifikanz (*) wurde durch den t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Zur Kontrolle der spezifischen Abhängigkeit der *in vitro* Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels und der verminderten BSEP Transkription, wurde eine Versuchsreihe mit 8-Methoxymethyl-IBMX (8-M-IBMX) durchgeführt (Abbildung 22). 8-M-IBMX steigert die Akkumulation von cGMP, während der cAMP-Spiegel nicht beeinflusst wird. cGMP ist ein, an intrazellulärer Signaltransduktion beteiligter, *second messenger* und 8-M-IBMX fördert cGMP-abhängige Signalwege. Die Steigerung des cGMP-Spiegels hat keinen signifikanten Einfluss auf die CDCA-vermittelte BSEP Genexpression.

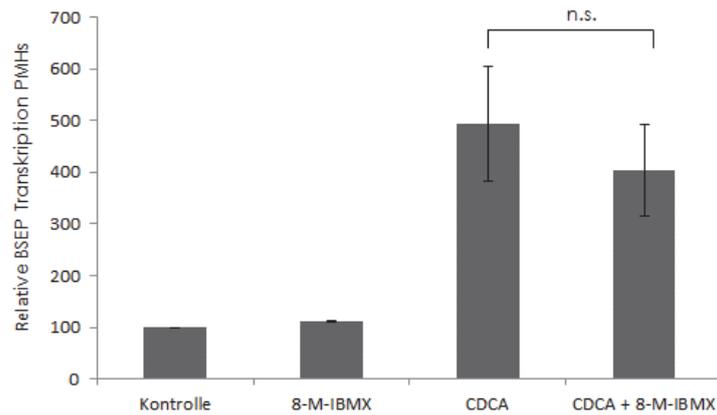


Abbildung 22 Der Einfluss von 8-M-IBMX auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression von PMHs Zur Untersuchung der Wirkung von 8-M-IBMX auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden PMHs mit 10 μ M 8-M-IBMX eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 50 μ M CDCA für acht Stunden stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA und 10 μ M 8-M-IBMX diene zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Um zu untersuchen, ob die Steigerung des cAMP-Spiegels den hemmenden Effekt auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription auch FXR-unabhängig ausüben kann, wurden Versuchsreihen diesbezüglich an FXR-deletierten PMHs durchgeführt (Abbildung 23). Es konnte kein signifikanter Einfluss von 8-Bromo-cAMP auf die BSEP Transkription nachgewiesen werden. Die Hemmung der CDCA-bedingten BSEP Expression durch cAMP ist abhängig von FXR als Transkriptionsfaktor.

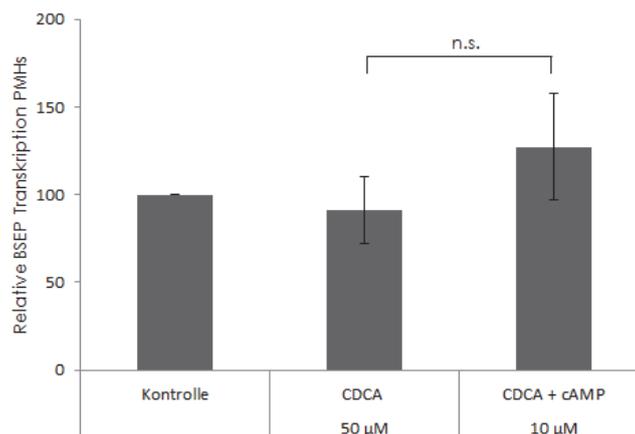


Abbildung 23 Der Einfluss von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription in FXR^{-/-} PMHs Zur Untersuchung der Wirkung von 8-Bromo-cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP mRNA Expression wurden FXR-defiziente PMHs mit 10 μ M 8-Bromo-cAMP eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 50 μ M CDCA für acht Stunden stimuliert. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

3.4 Der Einfluss von IL-1 β auf die Chemokin-Expression

3.4.1 IL-1 β fördert das translationale Chemokin-Expressionsprofil

Die vorangegangenen Versuchsergebnisse belegen, dass IL-1 β die CDCA-induzierte BSEP Expression durch eine Heraufregulation der intrazellulären cAMP-Konzentration hemmt. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Chemokine über G-Protein gekoppelte Rezeptoren signalisieren und so einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bedingen können (Zhao *et al.* 2014). Um zu klären, ob die IL-1 β -induzierte Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration in Hepatozyten möglicherweise über die Induktion der Expression von Chemokinen vermittelt wird, sollte zunächst geklärt werden, welche Chemokine in Hepatozyten durch IL-1 β führend induziert werden. Hierzu wurden Hepatozyten mit IL-1 β stimuliert und die Chemokinproduktion im Überstand mit Hilfe eines Chemokin-Protein Arrays bestimmt, welches die orientierte Analyse von 25 Chemokinen parallel ermöglichte (Abbildung 24). Die Stimulation mit IL-1 β führte zu einer vermehrten Sezernierung der meisten der 25 in diesem Assay getesteten Chemokine. Dies verdeutlichte schon optisch die intensivere Signalwiedergabe aufgrund vermehrter Antigen-Antikörperbindung zwischen unbehandelter Kontrolle (24A links) und IL-1 β behandelter Probe (24A rechts). Die Umrechnung der Signalintensität und die Wiedergabe in Pixeldichte ermöglichte eine zahlenmäßige Datenerfassung (24B). 68 % aller Chemokine wurden vermehrt sezerniert, bei 20 % konnte eine verminderte Sezernierung gemessen werden und bei 12 % aller getesteten Chemokine bestand kein auffälliger Unterschied zwischen unbehandelter Kontrolle und IL-1 β Stimulation. Die Chemokine, deren Expression durch IL-1 β heraufreguliert wurde, gehören vorrangig zur Familie der CC- und CXC-Chemokine (24B), wobei unter anderem die Expression der CXCR2 Liganden CXCL 1, 2 und 5 durch IL-1 β induziert wurde (24C) sowie die Expression von CCL 22 und CCL 5.

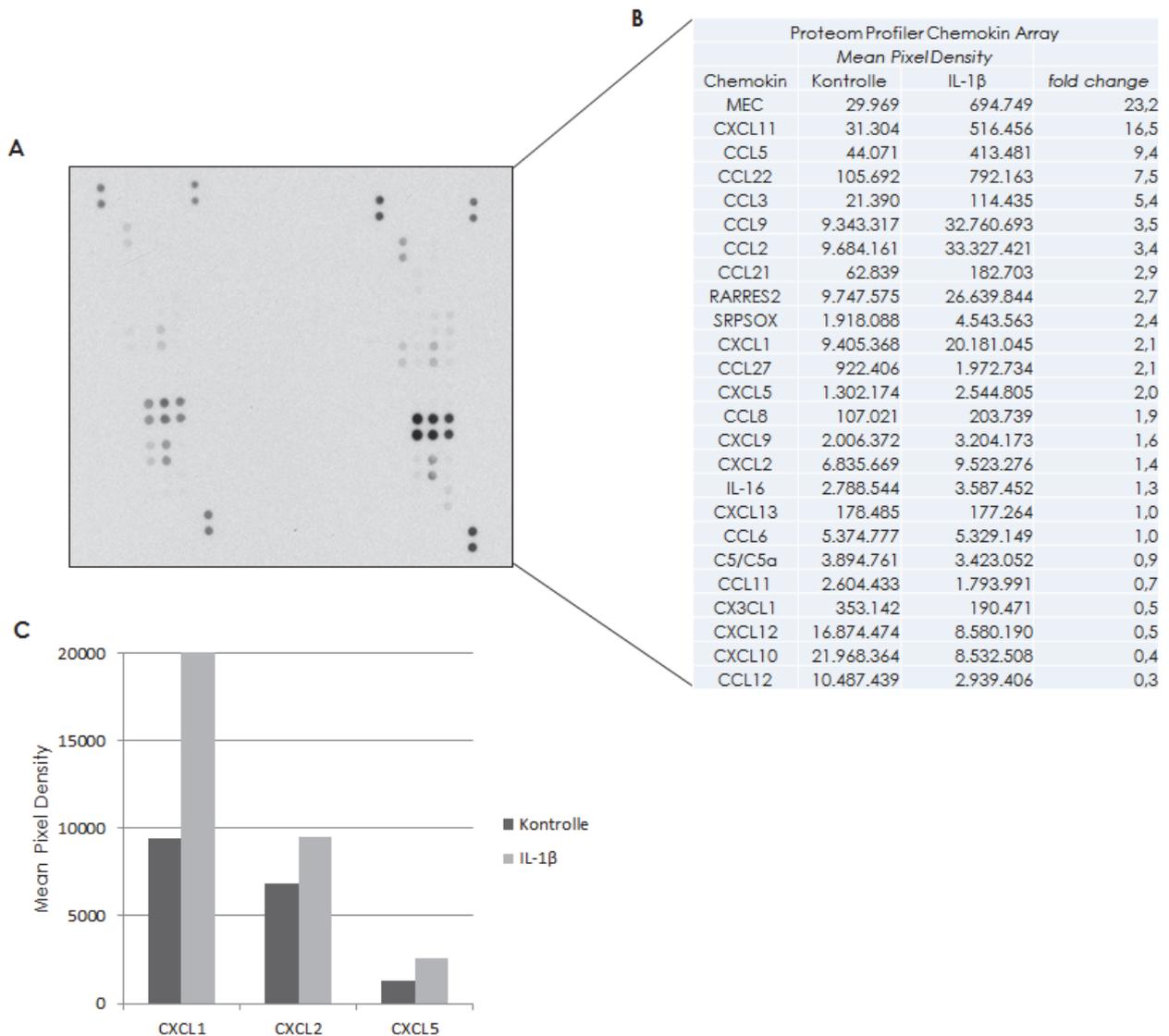


Abbildung 24 Analyse der Chemokinexpression des Zellkulturüberstands von PMHs stimuliert mit IL-1 β PMHs wurden über acht Stunden mit 0,1 ng/ml IL-1 β stimuliert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und über Zentrifugation aufgereinigt. 1 ml Zellkulturüberstand wurde in Kombination mit dem Detektions-Antikörper-Mix pro vorab geblockter Nitrozellulosemembran eingesetzt und über Nacht inkubiert. Nach ausreichend durchgeführten Waschschriffen wurde mittels Strepdavidin-HRP die Signaldetektion nach Filmentwicklung ermöglicht. Dargestellt in Abbildung **A** die Signalentwicklung nach 5 Minuten Expositionszeit bei der Membran mit der unbehandelten Kontrolle (links) und der Membran mit dem Zellkulturüberstand nach acht Stunden IL-1 β Stimulation der PMHs (rechts). **B** zeigt die tabellarische Ergebnisdarstellung aller 25 getesteten Chemokine und die relative Expressionsänderung zwischen unbehandelter Kontrolle und IL-1 β -Behandlung als *fold change* aufgelistet nach abnehmender Expression nach Auswertung mit der Software ImageJ. **C** zeigt graphisch den Unterschied der an den Überstand sezernierten CXC-Chemokine CXCL 1, 2 und 5 zwischen unbehandelten PMHs als Kontrolle und der IL-1 β Behandlung von PMHs.

Zur quantitativen Erfassung der in Abbildung 24 C dargestellten Ergebnisse wurden IL-1 β Konzentrationsreihen erstellt. PMHs wurden mit IL-1 β behandelt und der aufgereinigte Zellkulturüberstand mittels spezifischer ELISAs für murines CXCL 1, 2 und 5 untersucht und der Chemokingehalt quantifiziert (Abbildung 25).

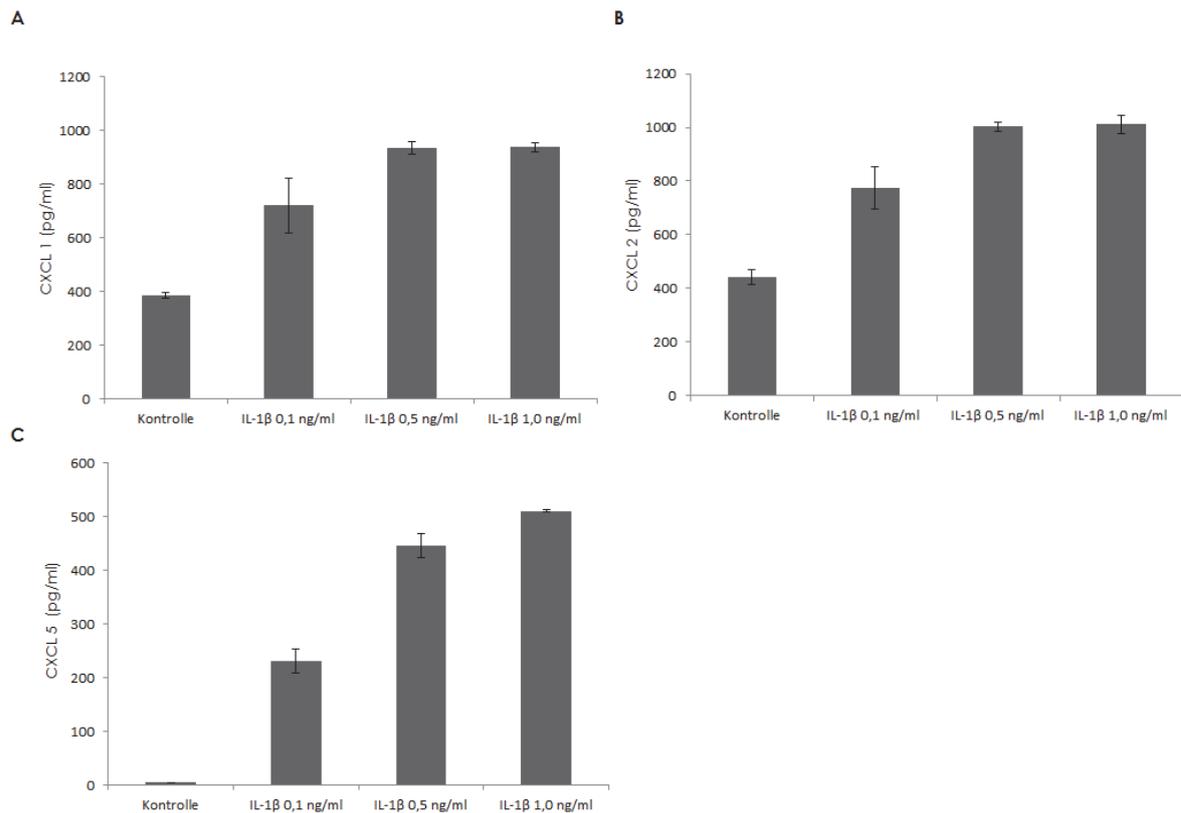


Abbildung 25 Quantitative Erfassung des konzentrationsabhängigen Einflusses von IL-1 β auf die Sezernierung von CXCL 1, 2 und 5 von PMHs in den Zellkulturüberstand Zur quantitativen Erfassung der vermehrten Sezernierung der CXC-Chemokine CXCL 1 (A), 2 (B) und 5 (C) nach IL-1 β Stimulation wurden PMHs mit 0,1, 0,5 und 1,0 ng/ml IL-1 β über acht Stunden stimuliert. Nach Aufreinigung wurde der Zellkulturüberstand für die spezifische Detektion und Quantifizierung der Chemokine mittels ELISA verwendet und nach Durchführung der Methode nach Herstellerangaben spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Korrektur bestimmt. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus fünf unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die Ergebnisse belegen, dass IL-1 β einen starken Einfluss auf die Chemokinexpression aufweist. Eine maximale Sezernierung von CXCL 1 (A) und CXCL 2 (B) wird schon ab einer Konzentration von 0,5 ng/ml IL-1 β ausgelöst. Diese Konzentration ist ausreichend, um bei CXCL 1 und 2, deren Basalkonzentration schon relativ hoch ist, eine verdoppelte Sezernierung hervorzurufen. Im Fall von CXCL 5 kommt es konzentrationsabhängig zu einer fast 500-fach erhöhten Sezernierung, da bei den nicht stimulierten Kontrollen so gut wie kein sezerniertes Protein im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte.

Gallensäuren können durch ihre Signalwirkung Zellmetabolismus und Zelldifferenzierung beeinflussen. Um einen Einfluss von CDCA auf die Chemokinsezernierung ausschließen zu können, wurde mittels der ELISA-Methode die Expression der CXC-Chemokine CXCL 1, 2 und 5 nach CDCA Stimulation im Zellkulturüberstand untersucht (Abbildung 26). CDCA hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sezernierung dieser CXC-Chemokine.

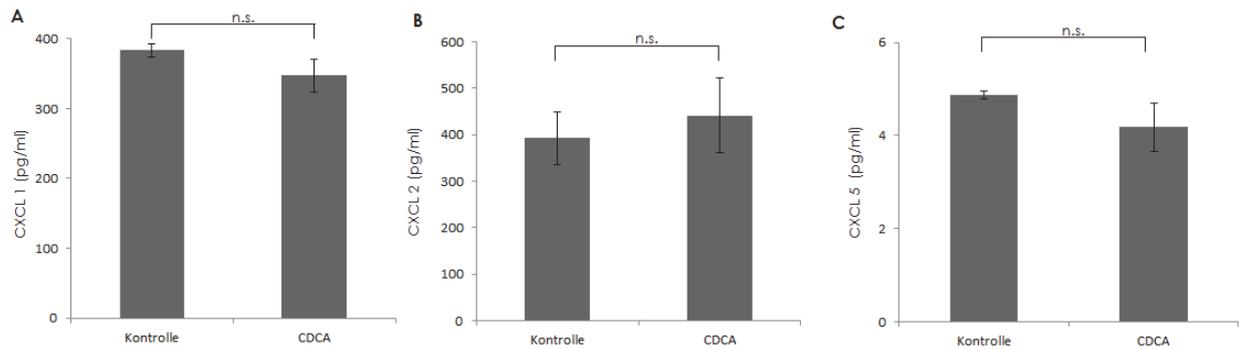


Abbildung 26 Der Einfluss von CDCA auf die Sezernierung von CXCL 1, 2 und 5 durch PMHs Zur Kontrolle des möglichen Einflusses von CDCA auf die Expression von CXCL 1 (A), CXCL 2 (B) und CXCL 5 (C) wurden PMHs mit 50 μ M CDCA über acht Stunden stimuliert und der Zellkulturüberstand für die Quantifizierung im ELISA verwendet. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus fünf unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet ($p < 0.05$).

3.4.2 IL-1 β fördert das transkriptionelle Chemokin-Expressionsprofil

Das transkriptionelle Chemokin-Expressionsprofil primärer muriner Hepatozyten wurde nach Stimulation mit IL-1 β geprüft. Pro Probe wurde mittels Genexpressionsanalyse die Expression von 84 verschiedenen Chemokin-assoziierten Genen durch Verwendung einer mit spezifischen Nukleotid-Primern versehenen Messplatte untersucht. Die für diesen Versuch präparierten PMHs wurden vor der Kultivierung mittels MACS-Technologie aufgereinigt. So konnte der Einfluss von Makrophagen auf das Ergebnis weitestgehend ausgeschlossen werden. Den Tabellen 5-8 ist die Auswertung mittels Δ -CT-Methode mit β -Glucoronidase (Gusb) als Referenzgen samt Standardabweichung (SD) und der Bezug behandelte Probe zu unbehandelter Kontrolle pro untersuchtem Gen zu entnehmen. Die in Tabelle 5 aufgelisteten Gene wurden durch IL-1 β Stimulation vermehrt exprimiert. Tabelle 6 stellt die Gene dar, welche in ihrer Expression eher unbeeinflusst blieben und Tabelle 7 nennt die durch IL-1 β negativ in ihrer Expression beeinflussten Gene. Deutlich wird, dass das Chemokin-Expressionsprofil weitestgehend positiv beeinflusst wird. Vorrangig wurden die ELR⁺ und inflammatorischen Mitglieder der CXC-Familie und deren Rezeptoren CXCR 1-3 sowie die meisten Mitglieder der CC-Familie und die Rezeptoren CCR3-6 vermehrt exprimiert. Das einzige Mitglied der murinen C-Familie, XCL1, wurde unter IL-1 β zwar ebenfalls hochreguliert, die Expression des zugehörigen Rezeptors XCR1 wurde jedoch stark herabreguliert. Wie bereits anhand des translationalen Chemokin-Expressionsprofils gezeigt (siehe 3.4.1), wurden die CXC-

Chemokine 1, 2 und 5 sowie deren assoziierter Rezeptor CXCR2 in verstärktem Maße exprimiert (Tabelle 8).

Tabelle 5 Transkripte von Chemokinen, Chemokinrezeptoren und Zytokinen, deren Expression durch IL-1 β in Hepatozyten positiv beeinflusst wird

	Kontrolle		IL-1 β		
	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Bezug Kontrolle = 100
Ccl 22	0,000536407	0,00026396	48907,2355	34578,7822	9117556554
Ccr 4	0,000845347	0,00060198	17717,38232	0,000018	2095870017
Cxcr2	0,001725911	0,0012204	6131,882002	0,00027	355283834,9
Cmtm2a	0,002870219	0,00202955	2100,324408	1429,16307	73176458,29
Cxcr3	0,000680014	0,0004812	10,99672131	0,0000013	1617131,54
Ccr8	0,004986553	0,0064548	38,47898503	0,000023	771655,0158
Slit2	0,004417344	0,00300506	26,40980017	3,5527E-15	597866,021
Cxcl10	0,129565397	0,01511874	142,9409087	0,00004	110323,3672
Cxcl1	0,617159831	0,04876626	498,9235971	5,6843E-14	80841,87792
Cmtm5	0,000245109	0,00034664	0,134907186	0,09539379	55039,74832
Cxcl5	0,016550524	0,00738616	6,984375899	2,45382144	42200,33187
Cxcl3	0,00715253	0,006568	1,170295369	0,39269503	16361,97782
Cxcl2	0,06838444	0,00408585	2,898323741	0,42990877	4238,27954
Ccl 20	0,101358156	0,02630905	3,468125933	0,50890616	3421,654542
Ccr6	0,001688767	0,00119414	0,032220181	0,04434291	1907,91121
Ccr 3	0,002092025	0,0015984	0,024127231	0,02978942	1153,295422
Ccl 7	0,281320967	0,04782728	2,509469065	0,15771951	892,0305844
Xcl1	0,00050224	0,00057744	0,002102863	0,00155243	418,6965895
CCI 12	0,000220966	0,00031249	0,000854694	0,00120872	386,7989457
Ccl 9	0,01147	0,00282311	0,038822151	0,02450593	338,4668943
Darc	0,001587034	0,00116404	0,005215634	0,0041226	328,6402686
Ccl 24	0,000257467	0,00036411	0,000779088	0,00010048	302,5973147
Ccr5	0,001309543	0,00131987	0,003875918	0,00229945	295,9748201
Tlr2	0,145507989	0,03641572	0,397169181	0,05891865	272,9535228
Pf4	0,00222025	0,00179642	0,005661377	0,00672937	254,9882442
Il16	0,003489604	0,00150551	0,008335684	0,00120522	238,8719374
Cmtm3	0,153755816	0,05800038	0,359684449	0,07208358	233,9322558
Mapk14	0,480262705	0,00697651	1,02199494	0,23544236	212,799147
Ccr2	0,064179207	0,01327686	0,136549094	0,00232735	212,7622021
Cxcl9	0,002313512	0,00061055	0,004911026	0,00251811	212,2758391
Cxcl13	0,11671647	0,00470044	0,22745923	0,00021	194,8818619
Ccl 25	0,160712073	0,01419115	0,304846355	0,09843081	189,6847882
Cmklr1	0,003481112	0,00054991	0,006514342	0,00921267	187,1339548
Tnf	0,001276571	0,00021181	0,002357424	0,00084145	184,6684335
Ccl 8	0,00106301	0,00108168	0,001954593	0,00032247	183,8734383

Ccl3	0,0015436	0,00112873	0,002703847	0,00219469	175,1650323
Ccl17	0,00392427	0,00253439	0,006773029	0,00047656	172,5933314
Cxcl16	2,948376385	0,4300486	5,042214259	0,58128509	171,016641
Il1b	0,001111291	0,00032282	0,001891867	0,00102257	170,240439
Cxcr1	6,66667E-05	4,714E-05	3,152582653	0,0000032	169,1770039
Itgam	0,013529602	0,01250044	0,021407043	0,02940519	158,2237454
C5ar1	0,011961414	0,01254785	0,018828455	0,0176798	157,4099397
Ackr2	0,001289925	0,00182423	0,001908892	0,00215323	147,9847159
Hif1a	0,925536591	0,10041331	1,329666567	0,04680599	143,6643975
Cxcl14	0,005343325	0,00085463	0,00756536	0,00166169	141,5852477
Tgfb1	0,208951407	0,00592873	0,285695524	0,02084154	136,7282126
Itgb2	0,028741414	0,02235557	0,03902351	0,01779693	135,7744943
Ackr4	0,006682701	0,0010309	0,009006716	0,00199101	134,7765701
Ccl11	0,001187623	0,00030476	0,001570064	0,0004115	132,2022105
Ccl28	0,000582099	0,0004158	0,000749142	0,00029405	128,6965881
Gpr17	0,012854503	0,00214373	0,01646424	0,00020052	128,0814971
Cmtm4	0,515185821	0,1136356	0,655575834	0,09114108	127,2503643
Cx3cl1	0,001555346	0,00141485	0,00194274	0,00109397	124,9072481
Ccl2	3450,603747	1,2E-08	4298,982124	5,251E-13	124,586375
Ccr10	0,001229703	0,00044475	0,001517031	0,00029882	123,3657038
Ccl4	0,001544955	0,00032337	0,00186755	0,00048782	120,8804936
Ccl1	0,001075998	0,00081291	0,001265652	0,00022398	117,625817

Tabelle 6 Transkripte von Chemokinen, Chemokinrezeptoren und Zytokinen, deren Expression durch IL-1 β in Hepatozyten nicht verändert wird

	Kontrolle		IL-1 β		
	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Bezug Kontrolle = 100
Cxcr6	0,005457952	0,00136878	0,005916633	0,0014055	108,4039015
Cxcr5	0,001383152	0,00057927	0,001494583	0,00042029	108,0563573
Il4	0,000583881	0,0004209	0,000606169	0,00019675	103,8171244
Tymp	0,00731919	0,00252364	0,007515143	0,0019636	102,6772441
Il6	0,001278729	0,00033625	0,001291105	0,00170371	100,9677978
Mapk1	3,215502688	0,42772296	3,188829694	0,15608177	99,1704876
Ackr3	0,022570856	0,00491192	0,021802421	0,01167496	96,59545237
Ccr9	0,004160292	0,00041336	0,003948711	0,00042342	94,91427236
Ppbp	0,000830592	0,00071496	0,000754641	9,7524E-05	90,85576677

Tabelle 7 Transkripte von Chemokinen, Chemokinrezeptoren und Zytokinen, deren Expression durch IL-1 β in Hepatozyten gehemmt wird

	Kontrolle		IL-1 β		
	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Bezug Kontrolle = 100
Cxcl11	21,78545631	0,000023	0,00120717	0,00041224	0,005541174
Ccr 2	252418,2563	114407,89	1332,501328	940,713319	0,527894197
Xcr1	94206,661	0,0000047	3021,450559	0,0000029	3,207257881
Ccr 1/1	0,002679233	0,0018945	0,000162774	0,0002302	6,075377602
Ccl 6	0,026768035	0,01781008	0,001839169	0,00226422	6,870766872
Infg	0,004649177	0,00592028	0,000535821	0,00075777	11,52507508
Ccr7	0,008858144	0,01066152	0,001074378	0,00025285	12,12869867
Cx3cr1	0,005861299	0,00335283	0,001063559	0,00143394	18,14544218
Fpr1	0,00304234	0,00190168	0,000718152	0,00017012	23,6052369
Ccl 26	0,000839847	0,00060852	0,000367634	5,8171E-05	43,77394461
Cxcr4	0,070379075	0,02834597	0,039491659	0,03358182	56,11278468
Ccr 1	0,003418574	0,00196032	0,002042682	0,00104889	59,75244649
Cxcl15	0,001858482	0,0004759	0,001127908	0,00015937	60,68973706
Ccl 5	0,049520773	0,01068565	0,03284851	0,01913386	66,33278988
Tlr4	0,039627406	0,00387476	0,029035593	0,01215277	73,27149482
Ccl 19	0,001424851	0,00022696	0,001058407	0,00025724	74,28190661
Cmtm6	0,959610106	0,00330709	0,720443326	0,03377139	75,07667139
Cxcl12	0,122555712	0,01215912	0,104300041	0,02574235	85,10418524

Tabelle 8 Der positive Einfluss von IL-1 β auf CXC-Chemokine und den Rezeptor CXCR2 in PMHs

	Kontrolle		IL-1 β		
	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Mittelwert (n=3)	SD (+/-)	Bezug Kontrolle = 100
Cxcl1	0,617159831	0,04876626	498,9235971	5,6843E-14	80841,87792
Cxcl2	0,06838444	0,00408585	2,898323741	0,42990877	4238,27954
Cxcl5	0,016550524	0,00738616	6,984375899	2,45382144	42200,33187
Cxcr2	0,001725911	0,0012204	6131,882002	0,00027	355283834,9

3.5 CXC-Chemokine hemmen die CDCA-bedingte Aktivierung der BSEP Genexpression

IL-1 β fördert konzentrationsabhängig die Expression von CXC-Chemokinen und steigert ebenso die intrazelluläre cAMP-Konzentration. cAMP wiederum übt einen großen Einfluss auf die GPCR-vermittelte Signaltransduktion aus. Da Chemokinerezeptoren zur Klasse der GPCRs gehören, sollte der Einfluss von CXC-Chemokinen auf die CDCA-bedingte Aktivierung des BSEP Gens untersucht werden. Zunächst wurden Vorversuche mit stabilisierten Protein-Standardlösungen (CXCL 1 und 2) durchgeführt (Abbildung 27).

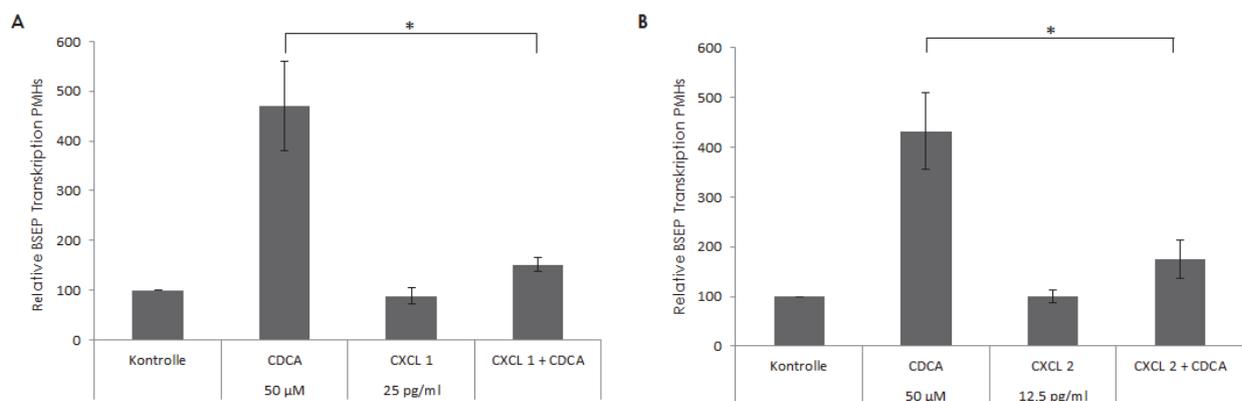


Abbildung 27 Der Einfluss von CXCL 1 und CXCL 2 auf die CDCA-vermittelte BSEP Genexpression Zur Untersuchung des Einflusses von CXCL 1 und CXCL 2 auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription wurden PMHs mit 25 pg/ml (**A**) bzw. 12,5 pg/ml (**B**) CXCL 1 und 2 eine Stunde präinkubiert und über acht Stunden mit 50 μ M CDCA stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 μ M CDCA und 25 bzw. 12,5 pg/ml CXCL 1 und 2 diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrolle. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus acht unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus acht unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Die Standardproteinlösungen CXCL 1 und 2 führen zu einer signifikanten Hemmung der BSEP Transkription. Um diesen inhibitorischen Effekt der Signaltransduktion der CXC-Chemokine und ihrem Rezeptor CXCR2 zuschreiben zu können, wurden Versuchsreihen durchgeführt, bei denen der Rezeptor mit Hilfe eines selektiven Inhibitors (SB 225002) chemisch blockiert und die Signaltransduktion so unterbunden wurde (Abbildung 28). Diese Blockierung führte zu einer partiellen Wiederherstellung der BSEP Transkription und war somit ein Hinweis dafür, dass für die Hemmung der CDCA-induzierten BSEP Expression die CXC-Signaltransduktion durch CXCR2 Aktivierung mitverantwortlich ist.

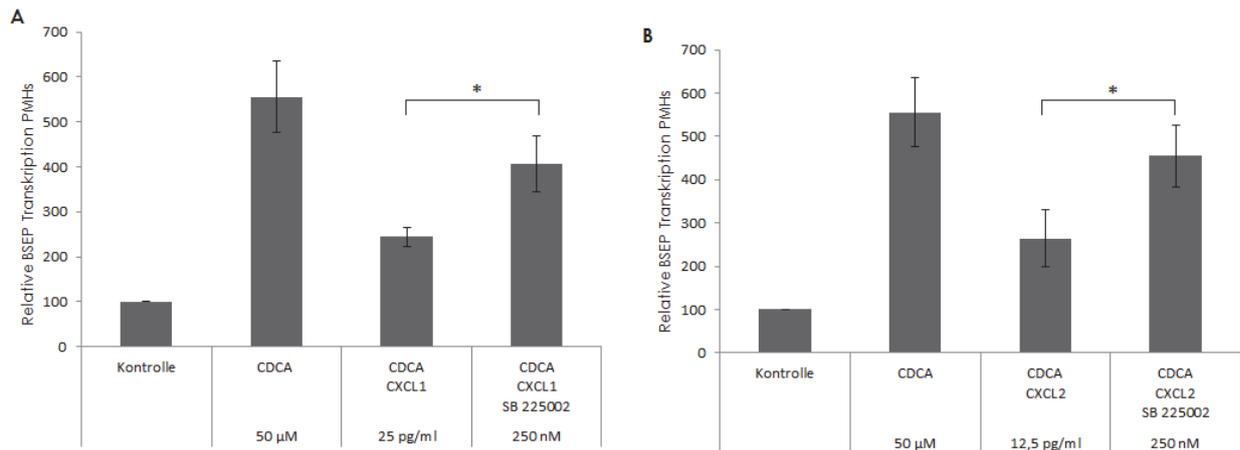


Abbildung 28 Hemmung der Chemokinwirkung auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription mittels CXCR2 Rezeptorhemmung Zur Untersuchung des Einflusses der Hemmung des Rezeptors CXCR2 und die Auswirkung auf den Einfluss von CXCL 1 und CXCL 2 auf die CDCA-induzierte BSEP Transkription wurden PMHs mit 250 nM SB 225002 eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 25 pg/ml **(A)** bzw. 12,5 pg/ml **(B)** CXCL 1 und 2 eine Stunde behandelt und über acht Stunden mit 50 µM CDCA stimuliert. Die alleinige Applikation von 50 µM CDCA und 25 bzw. 12,5 pg/ml CXCL 1 und 2 diente zusammen mit den unbehandelten Zellen als Kontrollen. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus acht unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus acht unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Um die Effekte der Chemokin-Proteinstandardlösungen auf deren bioaktive Wirkung zurückführen zu können, wurde die Aktivierung intrazellulärer Signalwege untersucht, die nachweislich durch Chemokine aktiviert werden (Curnock *et al.* 2002). Dies sind unter anderem der PI3K/Akt- und der MAPK/Erk1/2 Signalweg (29B). Die Stimulation mit den Chemokin-Proteinstandardlösungen führte zu verschiedenen Zeitpunkten zu einer Aktivierung bzw. Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt. Weiterhin wurde untersucht, ob die Chemokin-Proteinstandardlösungen ein chemotaktisches Potential aufweisen und die Migration neutrophiler Granulozyten auslösen können (29A). Die Einzelgabe der Chemokin-Proteinstandardlösungen führte zu einer leichtgradigen Migration von neutrophilen Granulozyten. Die Kombination von CXCL 1 und CXCL 2 steigerte diese jedoch auf ein zur Positivkontrolle vergleichbares Maß (A).

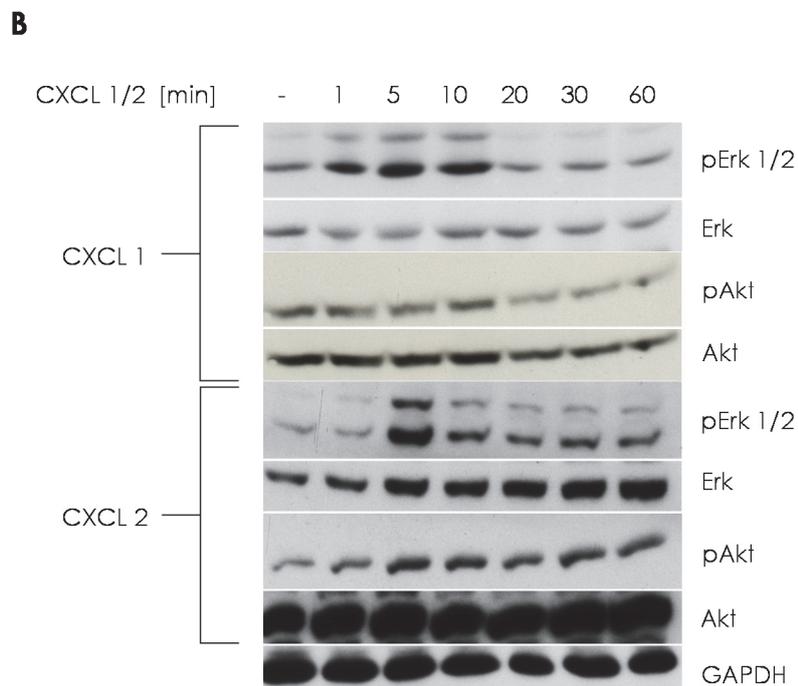
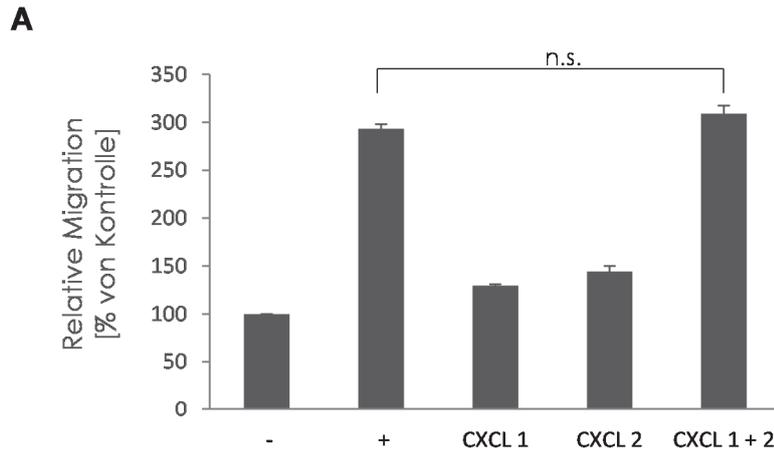


Abbildung 29 Nachweis der Bioaktivität der verwendeten CXCL 1 und CXCL 2 Proteinstandardlösungen

(A) Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und in Zellkultureinsätze ausgesät. Zur Auslösung der Migration wurde Kultivierungsmedium mit 25 bzw. 12,5 pg/ml CXCL 1 und CXCL 2 oder deren Kombination versetzt. Reines Nährmedium diente als Negativkontrolle, konditioniertes Kulturmedium nach Stimulation von PMHs mit 50 ng/ml *hepatocyte growth factor* (HGF) und 10 ng/ml TNF α über 24h diente als Positivkontrolle. Nach 24h Inkubation wurde das Ergebnis spektrographisch ausgewertet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet ($p < 0.05$). **(B)** Zur Untersuchung der Aktivierung von Signalwegen durch Chemokine wurde die Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt durch die Stimulation mit den CXCL 1 (25 pg/ml) und CXCL 2 (12.5 pg/ml) Proteinstandardlösungen in einer Zeitreihe untersucht (1, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten), die Proben geerntet und die Proteinlysate mittels WB-Analyse untersucht.

Zur weiterführenden Analyse der Hemmung der CDCA-vermittelten BSEP Genexpression durch CXC-Chemokine wurden rekombinant hergestellte murine Proteine verschiedener Fabrikate eingesetzt. Diese wurden in einem großen Konzentrationsspektrum eingesetzt, u.a. in Anlehnung an die durchgeführten Vorversuche mit den Proteinstandardlösungen (Abbildung 27) oder die quantitativen Ergebnisse der CXC-Sezernierung nach IL-1 β Stimulation (siehe 3.4.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

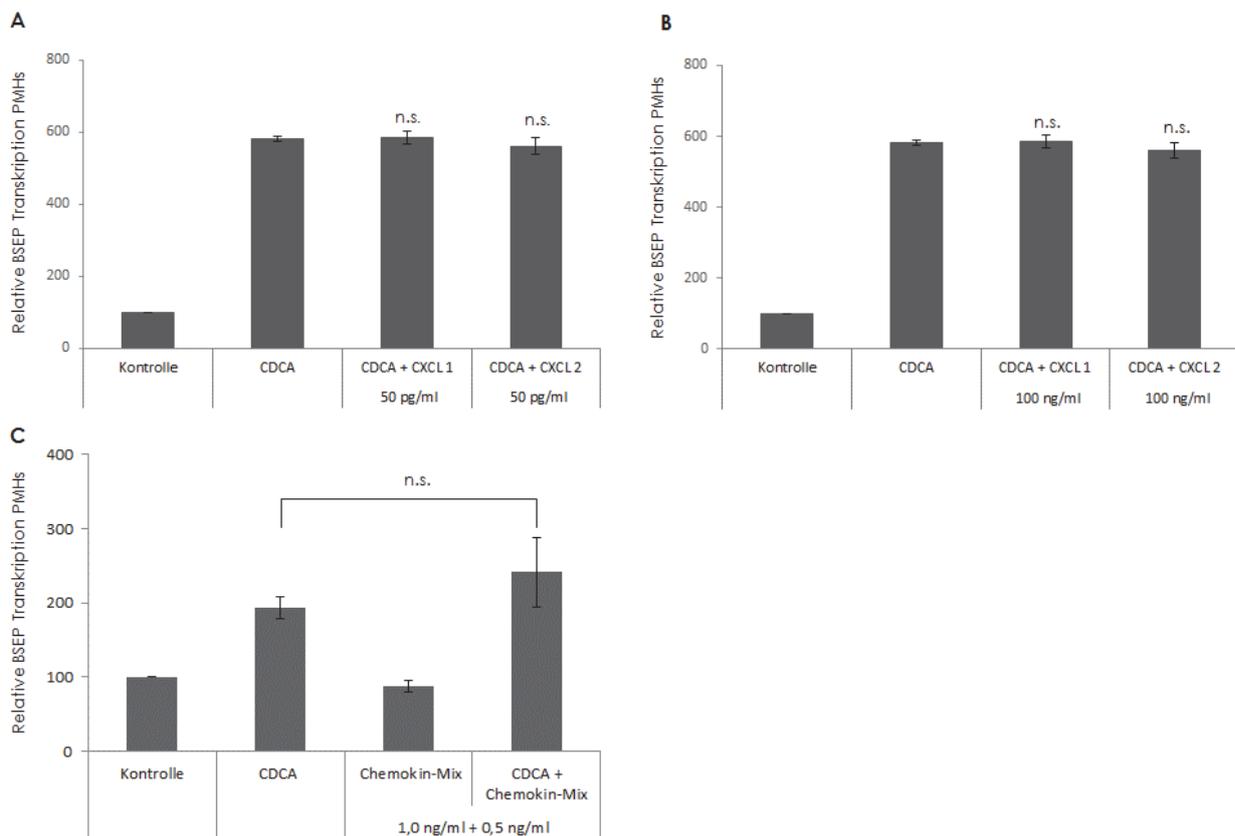


Abbildung 30 Der Einfluss rekombinanter Chemokine auf die CDCA-induzierte BSEP Expression in PMHs Zur Untersuchung des Einflusses von rekombinanten Chemokinen verschiedener Hersteller (Peprotech **(A)**, Cell Signaling **(B)**, Sigma Aldrich **(C)**) wurden PMHs mit 50 pg/ml **(A)** CXCL 1 und CXCL 2, 100 ng/ml **(B)** CXCL 1 und CXCL 2 oder 1,0 ng/ml (CXCL 1 und CXCL 2) bzw. 0,5 ng/ml (CXCL 5) **(C)** einzeln oder in Kombination eine Stunde präinkubiert und anschließend für acht Stunden mit 50 μ M CDCA stimuliert. Die Proben wurden anschließend lysiert und nach der Präparation der RNA und reversen Transkription der cDNA durch qRT-PCR semi-quantitativ das Expressionslevel von BSEP bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf unbehandelte Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Durch den Einsatz rekombinant hergestellter Chemokine wurde keine signifikante Hemmung der CDCA-vermittelten BSEP Expression erreicht. Untersuchungen mit einer größeren Konzentrationsbandbreite, simultaner Applikation mit dem Stimulus CDCA oder einer verkürzten Versuchsdauer wurden ebenfalls durchgeführt, lieferten aber ebenfalls keinen Beleg für ein hemmenden Einfluss der verwendeten CXC-Chemokine (Ergebnisse

nicht gezeigt). Die Durchführung von Migrationsassays mit neutrophilen Granulozyten zum Test der Bioaktivität zeigte ebenso keinen Effekt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Aufgrund der versuchstechnischen Wirkungslosigkeit der getesteten rekombinanten Chemokine wurden Untersuchungen zur Klärung des Einflusses von konditioniertem Zellkulturüberstand durchgeführt. Der förderliche Einfluss von IL-1 β auf die Genexpression und Sezernierung von CXC-Chemokinen wurde bereits gezeigt (siehe Abbildung 24 C bzw. Tabelle 8). Um den Einfluss der sezernierten CXC-Chemokine nach IL-1 β Stimulation auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription zu untersuchen, wurden zur Herstellung des konditionierten Überstands PMHs mit IL-1 β stimuliert. Bei PMHs wurde einen Tag nach der Zellpräparation das Kultivierungsmedium gegen den konditionierten Zellkulturüberstand ausgetauscht und die Zellen mit CDCA stimuliert (Abbildung 31). Durch den Einsatz von konditioniertem Zellkulturüberstand wurde die BSEP Expression signifikant gehemmt.

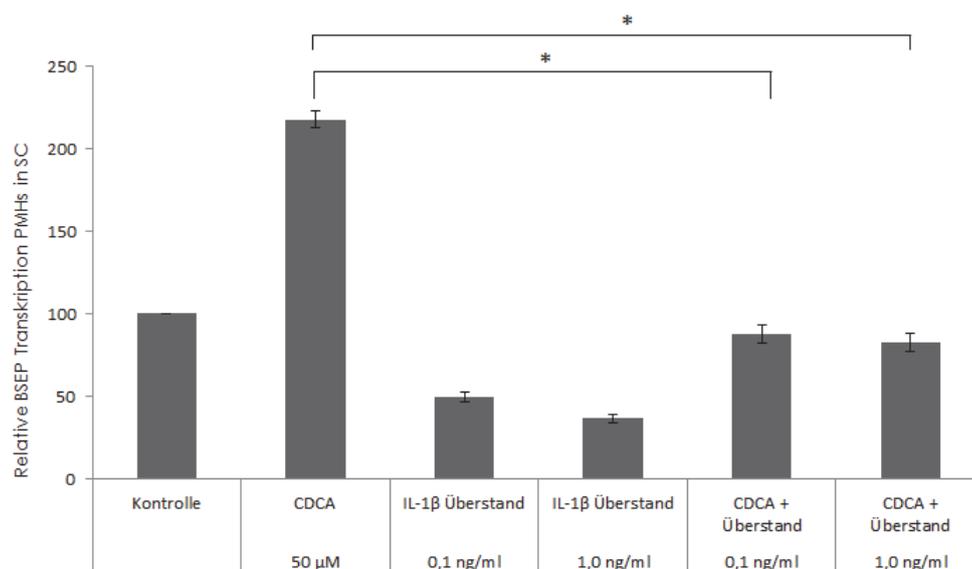


Abbildung 31 Der Einfluss von durch IL1- β Inkubation konditioniertem Kultivierungsmedium von PMHs auf die CDCA-vermittelte BSEP Transkription von PMHs in SC Zur Herstellung des konditionierten Überstands wurden PMHs über acht Stunden mit 0,1 ng/ml bzw. 1,0 ng/ml IL-1 β stimuliert. Nach Beendigung der Stimulationsdauer wurde der konditionierte Überstand abgenommen und über Zentrifugation von Zellresten bereinigt. Für die Versuchsdurchführung wurde bei PMHs einen Tag nach der Zellpräparation und Kultivierung in SC das Kultivierungsmedium gegen das vorab vorbereitete konditionierte Zellkulturmedium ausgetauscht und nach einer Stunde Präinkubation mit 50 μ M CDCA stimuliert und über acht Stunden inkubiert. Die Proben wurden anschließend lysiert und nach der Präparation der RNA und reversen Transkription der cDNA mittels qRT-PCR semi-quantitativ das Expressionslevel von BSEP bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf unbehandelte Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Um sicherzustellen, dass für die BSEP Hemmung die CXC-Chemokin Signaltransduktion verantwortlich ist, wurden erneut Versuche mit konditioniertem Zellkulturüberstand durchgeführt. Zusätzlich wurden die PMHs mit dem selektiven CXCR2 Inhibitor SB 225002 inkubiert (Abbildung 32). Die durch CDCA-induzierte Aktivierung des BSEP Gens wurde erwartungsgemäß, in Anlehnung an die in Abbildung 31 dargestellten Ergebnisse, durch den Überstandstransfer signifikant inhibiert. Die Zuführung des CXCR2 Inhibitors SB 225002 führte zu einer Aufhebung dieses inhibitorischen Effekts. Die Ergebnisse belegen eine Beteiligung der bioaktiven CXC-Chemokin-Signaltransduktion bei der Herabregulation der CDCA-induzierten BSEP Expression in dem ausgewählten Setting.

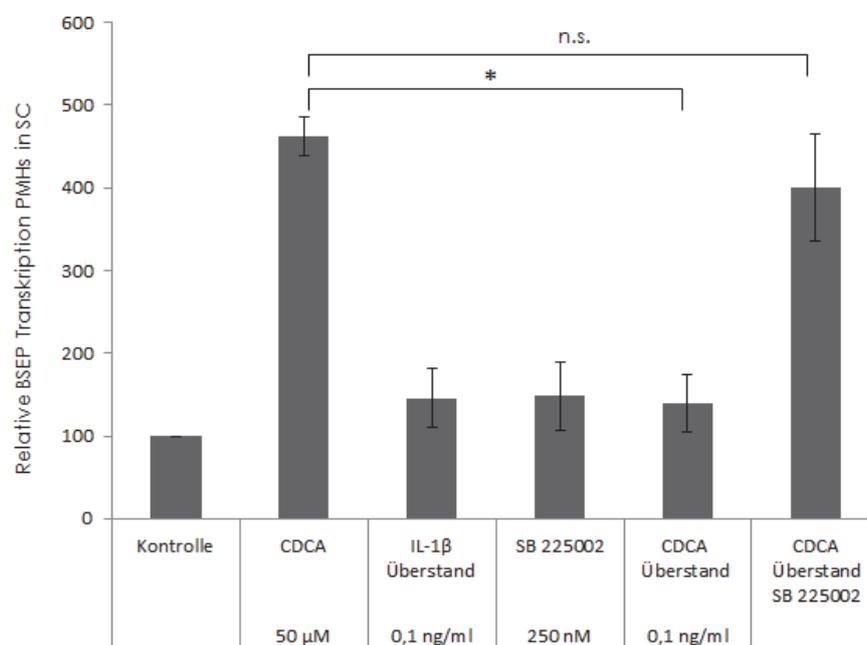


Abbildung 32 Die Aufhebung des inhibitorischen Effekts des Überstandstransfers auf die CDCA-stimulierte BSEP Transkription von PMHs in SC Zur Herstellung des konditionierten Überstands wurden PMHs über acht Stunden mit 0,1 ng/ml IL-1 β stimuliert. Nach Beendigung der Stimulationsdauer wurde der konditionierte Überstand abgenommen und über Zentrifugation von Zellresten bereinigt. Für die Versuchsdurchführung wurde bei PMHs einen Tag nach der Zellpräparation und Kultivierung in SC das Zellkulturmedium gegen das vorab vorbereitete konditionierte Zellkulturmedium ausgetauscht und nach einer Stunde Präinkubation mit 50 μ M CDCA stimuliert und über acht Stunden inkubiert. Für die Präinkubation mit 250 nM SB 225002 wurden die PMHs in SC vor dem Überstandstransfer für eine Stunde vorbehandelt. Nach dem Überstandstransfer wurde ebenfalls 250 nM SB 225002 hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend lysiert und nach der Präparation der RNA und reversen Transkription der cDNA mittels qRT-PCR semi-quantitativ das Expressionslevel von BSEP bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf unbehandelte Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

3.6 Die CXCR2 Hemmung negiert den inhibitorischen Effekt von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP Genexpression

Die zusammenführende Beweisuntersuchung der IL-1 β -vermittelten und über die CXCR2-Chemokin-Signaltransduktion-übertragenen Hemmung der CDCA-vermittelten BSEP Transkription, sollte nun abschließend geprüft werden. Dazu wurden Versuchsreihen mittels Präinkubation des CXCR2 Inhibitors SB 225002 und der anschließenden Inkubation mit IL-1 β und abschließenden Stimulation mit CDCA in allen bisher *in vitro* verwendeten Zellsystemen (PMHs, PMHs in SC und HepaRG Zelllinie) durchgeführt (Abbildung 33).

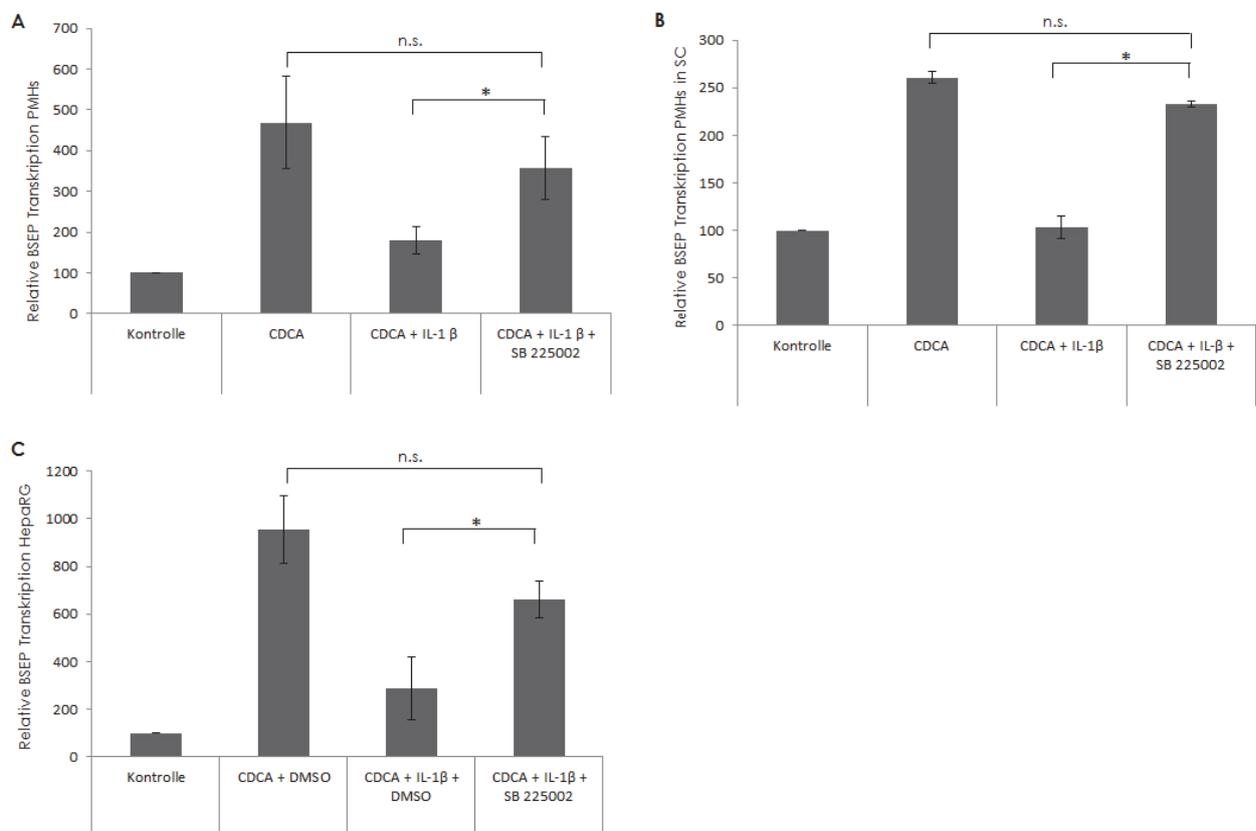


Abbildung 33 Die Aufhebung des IL-1 β Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Hemmung des Rezeptors CXCR2 Zur Untersuchung des Einflusses der CXCR2 Hemmung auf die Wirkung der IL-1 β Suppression der CDCA-vermittelten BSEP Transkription wurden PMHs (**A**), PMHs in SC (**B**) und HepaRG Zellen (**C**) mit 250 nM SB 225002 eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 0,1 ng/ml IL-1 β behandelt. Abschließend wurden die Zellen mit 50 μ M CDCA stimuliert und über acht Stunden inkubiert. Die Proben wurden anschließend lysiert und nach der Präparation der RNA und reversen Transkription der cDNA mittels qRT-PCR semi-quantitativ das Expressionslevel von BSEP bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA bzw. HPRT1 als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse belegen, dass durch die selektive Blockierung des CXCR2-Chemokin Rezeptors CXCR2, der inhibitorische Effekt von IL-1 β auf die CDCA-induzierte BSEP Expression von primären murinen Hepatozyten (A und B) und der Hepatoma-Zelllinie HepaRG (C) fast ganz aufgehoben werden konnte. Zur Unterstützung dieser Ergebnisse wurden zwei weitere CXCR2 Inhibitoren (Cpd 19 und SB 265610) in einem ähnlichen Versuchsaufbau getestet (Abbildung 34). Diese Versuchsreihen lieferten vergleichbare Ergebnisse der partiellen Aufhebung des IL-1 β Effekts auf die BSEP Transkription durch die der CXCR2 Hemmung.

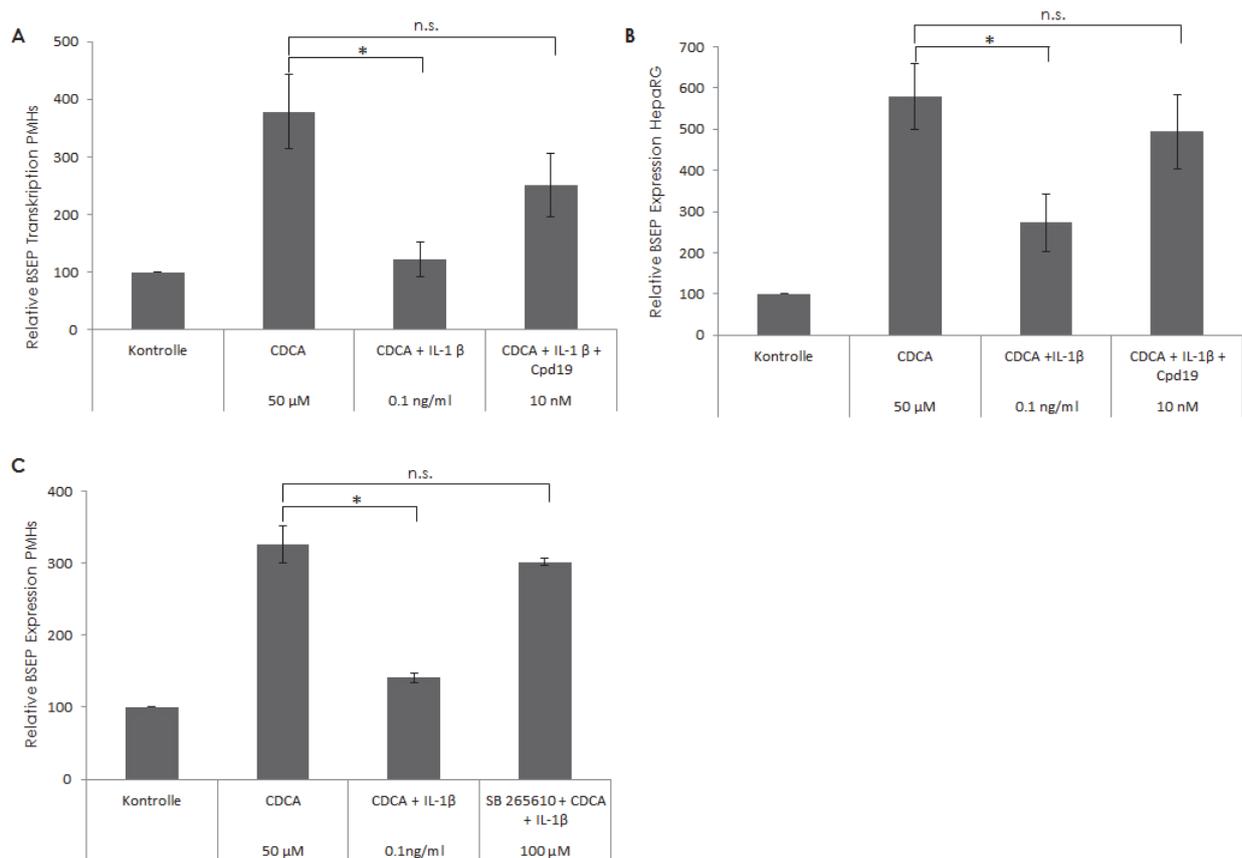


Abbildung 34 Die Aufhebung des IL-1 β Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Hemmung des Rezeptors CXCR2 Zur Untersuchung des Einflusses der CXCR2 Inhibition auf die Wirkung der IL-1 β Suppression der CDCA-vermittelten BSEP Transkription wurden PMHs (A und C) und HepaRG Zellen (B) mit 10 nM Cpd 19 (A und B) bzw. 100 μ M SB 265610 (C) eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 0,1 ng/ml IL-1 β behandelt. Abschließend wurden die Zellen mit 50 μ M CDCA stimuliert und über acht Stunden inkubiert. Die Proben wurden anschließend lysiert und nach der Präparation der RNA und reversen Transkription der cDNA mittels qRT-PCR semi-quantitativ das Expressionslevel von BSEP bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA bzw. HPRT1 als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf unbehandelte Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Zur Kontrolle der Ergebnisse im Kontext der CDCA-bedingten BSEP Transkription und auf Basis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors FXR, wurden die bereits durchgeführten Versuche zur CXCR2 Hemmung ebenfalls an FXR-defizienten PMHs durchgeführt (Abbildung 35). Weder die Stimulation mit CDCA noch die Gabe von IL-1 β oder die CXCR2-Hemmung führten zu einer signifikanten Transkriptionsregulation des BSEP Gens im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

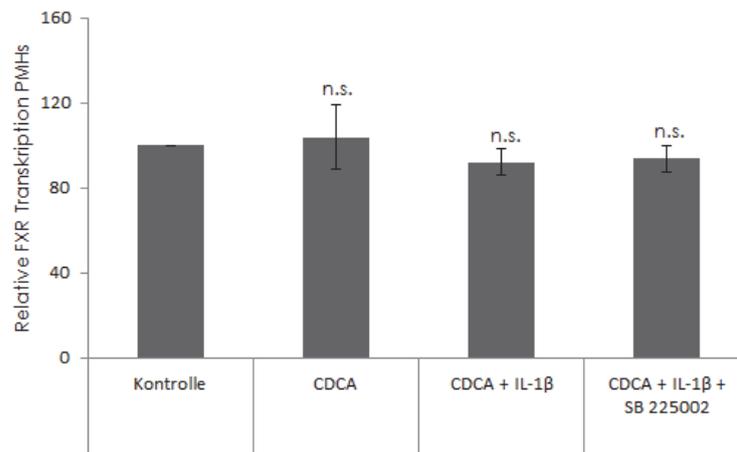


Abbildung 35 Die partielle Aufhebung des IL-1 β Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Hemmung des Rezeptors CXCR2 ist in FXR-defizienten Hepatozyten nicht induzierbar. Zur Untersuchung des Einflusses der CXCR2 Hemmung auf die Wirkung der IL-1 β Suppression der CDCA-vermittelten BSEP Transkription wurden FXR-defiziente PMHs mit 250 nM SB 225002 eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 0,1 ng/ml IL-1 β behandelt. Abschließend wurden die Zellen mit 50 μ M CDCA stimuliert und über acht Stunden inkubiert. Die Proben wurden anschließend lysiert und nach der Präparation der RNA und reversen Transkription der cDNA mittels qRT-PCR semi-quantitativ das Expressionslevel von BSEP bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche auf unbehandelte Kontrollen normalisiert wurden. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test bestimmt ($p < 0,05$).

Den vorangegangenen Ergebnissen zufolge wird der IL-1 β Effekt unter Beteiligung der CXCR2-Chemokin-Signaltransduktion vermittelt. Weiterhin hat IL-1 β einen positiven Einfluss auf die intrazelluläre Akkumulation von cAMP (siehe Abbildung 17). Nun sollte der Einfluss der partiellen Aufhebung des IL-1 β Effekts durch Hemmung des CXCR2 Rezeptors im Kontext der Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels untersucht werden. Dazu wurde ein cAMP Assay mit PMHs durchgeführt (Abbildung 36).

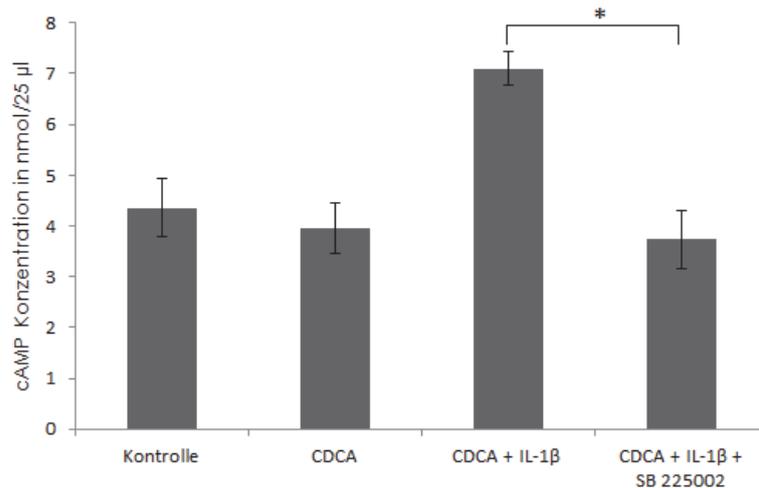


Abbildung 36 Der Einfluss der partiellen Aufhebung des IL-1 β Effekts auf die CDCA-induzierte BSEP Expression durch Hemmung des Rezeptors CXCR2 auf dem Level des intrazellulären cAMP-Spiegels von PMHs PMHs wurden in einer 96-Loch Platte kultiviert und mit 500 μ M IBMX 30 Minuten präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten lang mit 50 μ M CDCA, 1,0 ng/ml IL-1 β und 250 nM SB 225002 oder der Kombination aus allen Agenzien inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden 25 μ l/Probe auf die Messplatte übertragen und nach Herstellerangaben weiterbehandelt. Die Messung am Luminometer wurde bei 425 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 1s/Loch durchgeführt. Die Auswertung der gemessenen RLU wurde unter Bezugnahme der Messwerte der durchgeführten cAMP-Standardreihe mittels des Statistikprogramms GraphPad Prism durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von fünf unabhängigen Experimenten berechnet und die Signifikanz (*) wurde mittels t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Das dargestellte Ergebnis belegt, dass die Hemmung der CXCR-Signaltransduktion zu einer signifikanten Verminderung der durch IL-1 β geförderten Akkumulation von cAMP führt. Abschließend lassen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf eine Beteiligung autokriner und cAMP-vermittelter Regulationsmechanismen im Kontext der IL-1 β -bedingten Herabregulation des Gallensalztransporters BSEP zur Auslösung einer Cholestase schließen.

4 Diskussion

Im Rahmen von Entzündungsprozessen kann eine hepatische Cholestase entstehen, die durch eine verminderte Expression von Transportproteinen in Hepatozyten und der Retention von Gallensäuren gekennzeichnet ist. Die durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 β ausgelöste Expressionshemmung der Transportproteine findet auf verschiedenen Ebenen statt. So kommt es u.a. zum Abbau der Transportproteine aus der Membran und zu ihrer Degradierung sowie zur Hemmung der Genexpression der Transporter, so dass die Bereitstellung für weiteren Nachschub neuer Transportproteine verhindert wird. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf eine weiterführende Analyse der Mechanismen, die für die Hemmung der durch Gallensäuren induzierten Genexpression des BSEP Gens durch inflammatorische Zytokine verantwortlich sind. Der Fokus liegt hierbei insbesondere auf der Regulation durch autokrine *feedback* Mechanismen.

4.1 Die Einflussfaktoren der FXR-vermittelten BSEP Transkription

4.1.1 CDCA und Glukokortikoide fördern die BSEP Genexpression

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Versuche durchgeführt, die der Festlegung der *in vitro* Kultivierungs- und Stimulationsbedingungen von PMHs dienten. Das Ziel war eine Maximierung der BSEP Genexpression. Die durchgeführten Versuche mit der hydrophoben Gallensäure CDCA belegen, dass eine Konzentration von 50 μ M CDCA keine zytotoxische Wirkung aufweist und zu einer maximalen BSEP Expression führt. Höhere CDCA-Konzentrationen verminderten die Zellviabilität und führten zu einer Abnahme der messbaren BSEP Transkripte. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Studien mit einer ähnlichen Fragestellung (Stayrook et al. 2005; Shen et al. 2008; Song et al. 2009; Scholmerich et al. 1984; Hillaire 1995; Schuetz et al. 2001a). Die Akkumulation von Gallensäuren, vor allem CDCA, kann sich negativ auf die mitochondriale Zellfunktion auswirken und Auslöser für das Erreichen kritischer Level an intrazellulärem, oxidativen Stress sein und sich hierdurch ab einer gewissen Konzentration negativ auf die zelluläre Viabilität auswirken (Rolo et al. 2000; Rolo et al. 2003; Tan et al. 2007). Ferner belegen die hier angeführten Ergebnisse, dass über einen Stimulationszeitraum von acht

Stunden hinaus kein weiterer signifikanter Anstieg der BSEP Expression unter Stimulation mit CDCA zu verzeichnen ist. Ein signifikant positiver Effekt auf die BSEP Expression konnte durch den Zusatz von synthetischem Glukokortikoid im Nährkulturmedium ausgelöst werden. Es ist bekannt, dass Dexamethason die Anheftung von primären Hepatozyten, ihr Überleben und die Zellmorphologie verbessert und sich außerdem positiv auf die BSEP Expression und die Ausbildung kanalikulärer Netzwerke auswirkt (Laishes und Williams 1976; Yamada *et al.* 1980; Warskulat *et al.* 1999). Diesen Effekt belegen verschiedene *in vitro* und *in vivo* durchgeführte Studien. Allerdings findet man in der Literatur auch kontroverse Studien, die Dexamethason keinen oder nur einen in sehr hohen Konzentrationen vorliegenden Effekt auf die BSEP Expression attestieren (Mörk *et al.* 2012; Luttringer *et al.* 2002; Rosales *et al.* 2013; Turncliff *et al.* 2004). Glukokortikoide wie Dexamethason können nicht nur den Transkriptionsfaktor FXR direkt bzw. indirekt aktivieren, sie sollen ebenfalls in der Lage sein, die Aktivierung von FXR und seinen Zielgenen unter bestimmten Konditionen zu antagonisieren (Rosales *et al.* 2013). Durch Stimulationsversuche mit FXR-deletierten Hepatozyten konnte in dieser Arbeit sichergestellt werden, dass die durch CDCA-induzierten Effekte FXR-vermittelt ausgelöst wurden. CDCA erweist sich als potenteste und effektivste Gallensäure zur Aktivierung von FXR und der an der Gallensäuren-Homöostase beteiligten Gene (Liu *et al.* 2014; Lew *et al.* 2004). Allerdings gibt es Hinweise, dass die durch FXR-Aktivierung vermittelte Gentranskription nur bei pathologischen Gallensäurenkonzentrationen eine Rolle spielt, da keine Beeinflussung der selben bei Zufütterung von CDCA in physiologischer und pharmakologischer Konzentration an Mäusen zu beobachten war (Song *et al.* 2015).

4.1.2 IL-1 β übt schon in geringer Konzentration einen maximal hemmenden Effekt auf die CDCA-bedingte BSEP Expression aus

Entzündungsreaktionen und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren können das Expressionsprofil von Transportproteinen in der Leber beeinflussen und infolgedessen eine Cholestase hervorrufen. So konnte in einer Reihe von Arbeiten belegt werden, dass pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 β die Expression von Transportproteinen in der Leber herabregulieren (Hartmann *et al.* 2002; Elferink *et al.* 2004; Donner *et al.* 2007; Diao *et al.* 2010). Die Hemmung der BSEP Genexpression ließ sich im Rahmen einer Sepsis- bzw. Endotoxin-assoziierten Cholestase, ausgelöst durch LPS-Injektion, an Mäusen nachweisen (Lickteig *et al.* 2007). Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte in der vorliegenden Arbeit der inhibitorische Effekt von TNF α und IL-1 β auf die CDCA-bedingte BSEP Transporterexpression durch *in vitro* Studien, durchgeführt an primären murinen Hepatozyten und der Hepatoma Zelllinie HepaRG, belegt werden. HepaRG Zellen sind aufgrund ihres Differenzierungsgrads, der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und der Expression wichtiger Merkmale primärer Hepatozyten ein gutes Modell zur Untersuchung von humanen Hepatozyten (Le Vee *et al.* 2013; Kanebratt und Andersson 2008; Cerec *et al.* 2007; Le Vee *et al.* 2006; Gripon *et al.* 2002).

Da in dieser Arbeit die Rolle von IL-1 β als Entzündungsmediator einer Sepsis-assoziierten Cholestase im Zusammenhang mit autokrinen Regulationsmechanismen untersucht werden sollte, wurde vornehmlich der genaue zeit- und konzentrationsabhängige Einfluss von IL-1 β auf die Expression des Gallensalztransporters BSEP untersucht. Hier konnte anhand von Konzentrationsreihen nachgewiesen werden, dass eine signifikante Hemmung der BSEP Expression bei PMHs schon bei einer Konzentration von 0,05 bzw. 0,1 ng/ml IL-1 β (ML/SC) erreicht werden konnte. Vergleichbare Studien wurden an murinen Hepatozyten mit einer Minimaldosis von 1 ng/ml IL-1 β durchgeführt (Diao *et al.* 2010). Weitaus höhere Konzentrationen IL-1 β mussten bei HepaRG Zellen eingesetzt werden, um einen zu den PMHs vergleichbaren Effekt auszulösen. Dieses Ergebnis wurde durch Befunde aus der Literatur bestätigt (Le Vee *et al.* 2008). Ferner wurde auch die zeitabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Expression des BSEP Gens untersucht. Es konnte noch bis zu zwei Stunden nach Gabe von CDCA ein inhibitorischer Effekt von IL-1 β auf die Expression von BSEP beobachtet werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Relevanz der transkriptionellen Transporterexpressionsregulation als entscheidenden Faktor der Langzeitregulation im Kontext der Entzündungsreaktion und Cholestase (Kosters und

Karpen 2010). Auch konnte in dieser Arbeit durch entsprechende Versuche mit IL1R1- und FXR-defizienten Hepatozyten belegt werden, dass der IL-1 β Effekt nur durch aktive Signaltransduktion des entsprechenden Rezeptors vermittelt wird und dass die IL-1 β -vermittelte Hemmung der BSEP Genaktivierung durch CDCA an FXR gekoppelt ist.

Es sind einige Arbeiten bekannt, die sich mit den Wirkungsmechanismen befassen, über die IL-1 β die Expression von BSEP reguliert. Ein Beispiel wäre die Genexpressionsregulation von FXR. Die meisten der beschriebenen Ansätze befassen sich aber mit der Modulation des FXR Interaktionspartners und nukleären Rezeptors RXRa (Kosters und Karpen 2010; Kosters *et al.* 2009; Fang *et al.* 2004; Schneider *et al.* 2013). Eine messbare Regulation der FXR Genexpression konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimenten mit IL-1 β nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine genaue Aufschlüsselung der an der IL-1 β Signaltransduktion beteiligten intrazellulären Faktoren zur Hemmung der FXR-abhängigen BSEP Genexpressionsregulation findet sich in der Literatur nicht. Es gibt Hinweise auf einen FXR-abhängigen und negativen *crossstalk* mit NF- κ B, einem wichtigen Schlüsselregulator der inflammatorischen intrazellulären Signaltransduktion (Wang *et al.* 2008). Weiterhin finden sich Hinweise für eine Erk-unabhängige Hemmung der BSEP Expression durch IL-1 β (Le Vee *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, die die Einflussnahme von NF- κ B und dem MAPK/Erk-Signalweg in diesem Kontext mittels Inhibitorstudien untersuchen sollten. Die hier durchgeführten Versuche lassen annehmen, dass unter den gewählten Bedingungen keine Beteiligung des NF- κ B- oder MAPK/Erk-Signalwegs an der IL-1 β -vermittelten Hemmung der CDCA-induzierten Aktivierung des BSEP Gens stattfindet (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.1.3 IL-1 β führt zum Anstieg von intrazellulärem cAMP, dessen Akkumulation die CDCA-bedingte BSEP Genexpression hemmt

Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion kontrolliert viele intrazelluläre Prozesse wie Gentranskription, Zellmetabolismus und Proliferation (Gancedo 2013; Zaccolo 2009). Die Verarbeitung extrazellulärer Signale wird durch definierte Zeit-, Konzentrations- und Kompartimentierungsparameter innerhalb der Zelle gewährleistet (Zaccolo 2011). Verschiedene extrazelluläre Stimuli, wie z.B. inflammatorische Mediatoren, führen zu einer Aktivierung cAMP-abhängiger Signalübertragung (Pullar und Isseroff 2005; Watts und Neve 2005). Umgekehrt wird seit Längerem der Einfluss von cAMP auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Rahmen von Entzündungen kontrovers diskutiert. Dies betont die temporal und lokal differierenden Regulationsmechanismen der cAMP-abhängigen Signaltransduktion (Verghese *et al.* 1995; Bailly *et al.* 1990; Chandra *et al.* 1995; Sung und Walters 1991; Motoyoshi *et al.* 2014; Westbom *et al.* 2014; Ouyang *et al.* 2013; Wei *et al.* 2015; Sands und Palmer 2005). In Vorversuchen wurde mit Hilfe von Inhibitoren versucht, die Identifizierung von Signalproteinen, die an der Vermittlung der inhibitorischen Effekte von IL-1 β auf die CDCA-induzierten BSEP Expression beteiligt sind, zu klären (Ergebnisse nicht dargestellt). Es konnte keine Beteiligung der untersuchten Signalproteine nachgewiesen werden. Dies lässt u.a. vermuten, dass z.B. NF- κ B keine Bedeutung für die Weiterleitung der inhibitorischen Effekte von IL-1 β in diesem Kontext hat. Somit stellte sich die Frage, welche möglichen Wege der intrazellulären Signalweiterleitung ebenfalls durch IL-1 β angestoßen bzw. beeinflusst werden. Aufgrund des großen Wirkungsspektrums von cAMP wurde untersucht, ob IL-1 β einen Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration dieses sekundären Botenstoffs hat. Die erzielten Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass IL-1 β zu einer Akkumulation von cAMP führt. Nun wurde weiterführend untersucht, ob die Stabilisierung und intrazelluläre Akkumulation von cAMP einen Einfluss auf die Regulation des BSEP Gens hat. Verschiedene Stabilisierungsansätze wurden dabei experimentell umgesetzt. In allen gewählten Ansätzen führte die Akkumulation von intrazellulärem cAMP zu einer Hemmung der Expression des BSEP Gens. Dieses Ergebnis lieferte einen Hinweis auf die Wirkungs-Synergie von IL-1 β und cAMP und identifizierte cAMP als hypothetischen Boten der IL-1 β Signaltransduktion. Die synergistische Wirkung von IL-1 β und cAMP wird in Arbeiten zur IL-6-vermittelten Regulation thyroidaler Autoimmunerkrankungen und der Chondrosarkom-Entstehung ebenfalls diskutiert (Szabo-Fresnais *et al.* 2008; Wang *et al.* 2014). Versuche zur Akkumulation von cAMP in FXR-defizienten Hepatozyten und die

Steigerung des cGMP-Pools zeigten keinen Einfluss auf die BSEP Expression. So lassen diese Versuche die Hypothese zu, dass der cAMP-Effekt an die CDCA-vermittelte Regulation durch FXR gekoppelt ist und ein spezifischer, vom cGMP-Pool unabhängiger Effekt durch cAMP vermittelt wird. Der Kontext-abhängige Charakter der cAMP-Signaltransduktion wurde bereits erwähnt und spielt auch bei der Regulation der BSEP Expression eine Rolle. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse belegen eine negative Expressionsregulation des BSEP Gens. Bei dem im Zuge einer Cholestase auftretenden Ausbau des BSEP Proteins aus der kanalikulären Membran hingegen wird cAMP und der Aktivierung der PKA eine eher protektive Rolle zum Erhalt des Transporters an seinem Wirkungsort zugesprochen (Misra *et al.* 2003; Crocenzi *et al.* 2005; Perez *et al.* 2006). Die in dieser Arbeit beschriebene, fördernde Wirkung von IL-1 β auf den cAMP-Spiegel und der Einfluss von cAMP auf die CDCA-vermittelte BSEP Expression lassen die Hypothese einer in diesem Kontext bestehenden und zusammenhängenden Signaltransduktion zu. Diese Hypothese stützen die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse, dass die Wirkung von IL-1 β auf die BSEP Transkription ERK-unabhängig ist (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies wird auch durch die Arbeit von Le Vee *et al.* belegt (Le Vee *et al.* 2008). Untersuchungen, durchgeführt an MK2-defizienten Hepatozyten, stützen außerdem die These einer p38 MAP-Kinase-unabhängigen Signaltransduktion unter den gewählten Bedingungen (Ergebnisse nicht dargestellt). Erklärend wären hier die bereits existierenden Erkenntnisse, dass cAMP diese Signalwege (Erk, JNK, p38) Kontext-abhängig inhibiert (Hsueh *et al.* 1995; Rao *et al.* 1996; Feng *et al.* 2002; Stork *et al.* 2002; Zhu *et al.* 2008).

4.2 IL-1 β induziert in PMHs präferentiell die Produktion von CXCR2-Liganden

Die bisherigen Erkenntnisse im Rahmen dieser Arbeit ließen vermuten, dass ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer Hemmung der CDCA-vermittelten Expression des BSEP Gens führt. IL-1 β führt zu einem signifikanten Anstieg der cAMP-Konzentration und ein wesentlicher Teil der cAMP-abhängigen, intrazellulären Signaltransduktion wird über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt. Nun sollte der Frage nachgegangen werden, ob weitere Faktoren, die GPCR zur intrazellulären Signalübertragung nutzen, beteiligt sind. Da Chemokine ihre Signale ebenfalls über GPCR vermitteln, lag die Annahme nahe, dass sie an der IL-1 β Signaltransduktion über cAMP beteiligt sind. Es sollte zunächst geprüft werden, welche Chemokine prädominant durch IL-1 β reguliert werden. Mittels Genexpressionsanalyse und einem Chemokin-Protein Array wurde die Chemokinproduktion von Hepatozyten untersucht. Unter IL-1 β Einfluss wurden die meisten der untersuchten Liganden der CC- und CXC-Familie vermehrt sezerniert. So auch die ELR⁺-positiven und inflammatorischen CXC-Liganden 1, 2 und 5. Auf Ebene der Genexpression wurden über 80 Chemokine und assoziierte Rezeptoren bzw. Faktoren untersucht. Auch hier wurden die meisten der untersuchten CC- und CXC-Liganden hochreguliert. Der einzige Ligand der murinen C-Familie, XCL1, wurde ebenfalls hochreguliert, der entsprechende Rezeptor, XCR1, wurde durch IL-1 β aber stark gehemmt. Im Besonderen wurde auch auf dieser Ebene die Akkumulation der über den Rezeptor CXCR2 signalisierenden ELR⁺-Chemokine CXCL 1,2 und 5 sowie die Expression des Rezeptors selbst gefördert. Inflammatorische CXC-Chemokine werden durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 β und TNF α als akute Antwort auf einen Entzündungsreiz vermehrt sekretiert (Fernandez und Lolis 2002; Calkins *et al.* 2002; Chang *et al.* 1994). Sie werden vornehmlich von Stimulus-aktivierten Makrophagen sezerniert und sind für die chemotaktische Aktivierung und Homöostase neutrophiler Granulozyten im Kontext der Inflammation, Angiogenese und Wundheilungsprozesse verantwortlich und vermitteln ihre Signale über den Rezeptor CXCR2 (Iida und Grotendorst 1990; Becker *et al.* 1994; Devalaraja *et al.* 2000; Wolpe *et al.* 1989; Persson *et al.* 2003; Mei *et al.* 2012). Auch Hepatozyten exprimieren Chemokine und im besonderen Maße als Antwort auf inflammatorische Stimuli (Rowell *et al.* 1997; Wang *et al.* 1999; Kuboki *et al.* 2008). Diese Befunde werden durch die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützt.

4.3 CXC-Chemokine hemmen die CDCA-induzierte BSEP Expression über Aktivierung des Rezeptors CXCR2

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch IL-1 β ein autokriner Regulationsmechanismus ausgelöst wird, der mittels cAMP zu einer CXC-Chemokin-Signaltransduktion durch CXCR2 Aktivierung führt und als Folge die BSEP Genexpression hemmt. Dies wurde experimentell untersucht, indem durch Versuchsreihen mit CXCL 1- und CXCL 2-Standardproteinlösungen die BSEP Expression signifikant gehemmt wurde. Durch Migrationsversuche konnte gezeigt werden, dass die Hemmung auf die Bioaktivität der Proteine zurückgeführt werden konnte. Der Chemokin-Effekt wurde durch einen spezifischen CXCR2 Inhibitor, der den für die Signalweiterleitung der Chemokine CXCL 1, 2 und 5 verantwortlichen Rezeptor hemmt, partiell aufgehoben. Die Versuche mit den Standardproteinlösungen konnten reproduzierbar dargestellt werden, wohingegen die Vielzahl an kommerziell erhältlichen und getesteten CXC-Chemokinen keinen vergleichbaren Effekt erzielen konnten. Eine mangelnde Bioaktivität wurde als mögliche Ursache angenommen und durch Migrationsversuche bestätigt. Eine fehlende kovalente Modifikation der Proteine könnte ein Grund für die mangelnde Bioaktivität sein. Um verlässlich prüfen zu können, ob die Mediatoren der Chemokinklasse im Kontext der IL-1 β Signaltransduktion von Bedeutung sind, wurden Überstandstransferversuche durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse des hepatozellulären Chemokin-Expressionsprofils unter IL-1 β belegte, dass CXCL 1, 2 und 5 vermehrt sezerniert werden und dementsprechend in hoher Konzentration im Zellkulturüberstand zu finden sind. Die BSEP Expression wurde nach dem Überstandstransfer signifikant inhibiert. Dieser Umstand konnte durch spezifische Hemmung des CXC-Chemokin Rezeptors CXCR2 aufgehoben werden. Die Hemmung der BSEP Expression wurde also spezifisch durch die CXC-Chemokine und die Aktivierung des Rezeptors CXCR2 vermittelt. Inflammatorische Chemokine wie CXCL 1, 2 und 5 werden auf Inflamationsreize hin ausgeschüttet (Fernandez und Lolis 2002; Savarin-Vuailat und Ransohoff 2007). Die Beteiligung von inflammatorischen CXC-Chemokinen an der Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen einer Cholestase auf Basis einer Sepsis-assoziierten Leberzellschädigung wird in der Literatur seit einiger Zeit diskutiert (Li *et al.* 2004; Dold *et al.* 2009). Der Einfluss von Chemokinen konnte ebenfalls für die obstruktive Cholestase am Mausmodell durch eine Gallengangsligatur (BDL) belegt werden. Durch Gallensäuren wird der Transkriptionsfaktor Egr-1 (*early growth*

response 1) angeregt und CXCL 2 hochreguliert (Kim *et al.* 2006; Allen *et al.* 2010). Weiterhin konnte belegt werden, dass durch Deletion des CXCR2 Gens die Signaltransduktion mittels IL-8 unterbunden und die Dauer der Cholestase am Mausmodell bei biliärer Atresie im Falle der Neugeborenencholestase vermindert wird (Bessho *et al.* 2014). Diese Chemokin-Effekte wirken durch die Rekrutierung von Immunzellen, der Propagation von Entzündungsprozessen und der allgemeinen Schädigung der Leberzellen im Zuge der Cholestase-Entstehung. Ein Nachweis des direkten Einflusses von Chemokinen auf die BSEP Expression, wie er in dieser Arbeit experimentell untersucht wurde und hier dargestellt wird, wurde bisher nicht beschrieben.

4.4 Die Hemmung der CXCR2-Aktivierung hebt den inhibitorischen Effekt von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte BSEP Expression auf

Aufgrund des Einflusses von IL-1 β auf die Chemokinexpression und den intrazellulären cAMP-Spiegel sowie die Hemmung der BSEP Expression durch CXC-Chemokine, wurde abschließend der direkte Einfluss der spezifischen Hemmung des Rezeptors CXCR2 auf die IL-1 β -vermittelte Herabregulation der CDCA-induzierten BSEP Expression geprüft. Diese wichtigen Versuche zur Prüfung der Gesamthypothese wurden in allen vorgestellten Zellsystemen durchgeführt und zur Sicherung der Ergebnisse mit drei selektiven Inhibitoren des Rezeptors CXCR2 durchgeführt. Die Hemmung der über CXCR2 Liganden vermittelten Signaltransduktion führte zu einer Aufhebung des IL-1 β Effekts. Abschließend wurde der Einfluss der Hemmung von CXCR2 auf den cAMP-Spiegel im Rahmen der IL-1 β Signaltransduktion untersucht. Auch hier konnte, im Einklang mit der Arbeitshypothese, ein signifikanter Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit der oben ausgeführten Überlegung, führt eine Hemmung der über CXCR2 Liganden vermittelten Signalübertragung zu einer signifikanten Reduktion des inhibitorischen Einflusses von IL-1 β auf die CDCA-vermittelte Expression des BSEP Gens. Die hier dargelegten Befunde legen somit nahe, dass die Hemmung der CDCA-induzierten BSEP Expression durch IL-1 β zu einem wesentlichen Teil indirekt über die Aktivierung von CXCR2 und den hierdurch bedingten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt wird. Dies ist ein Hinweis für die Existenz eines autokrinen Signaltransduktionsmechanismus zwischen Zytokin- und Chemokin-Mediation im Kontext einer durch Entzündungsmediatoren

induzierten Cholestase (siehe Abbildung 38). Weiterführende Analysen werden einen wichtigen Beitrag leisten zur genaueren Identifizierung dieses, im Kontext der Sepsis-induzierten Expressionsregulation von Transportproteinen der Leberzelle, neu entdeckten Mechanismus.

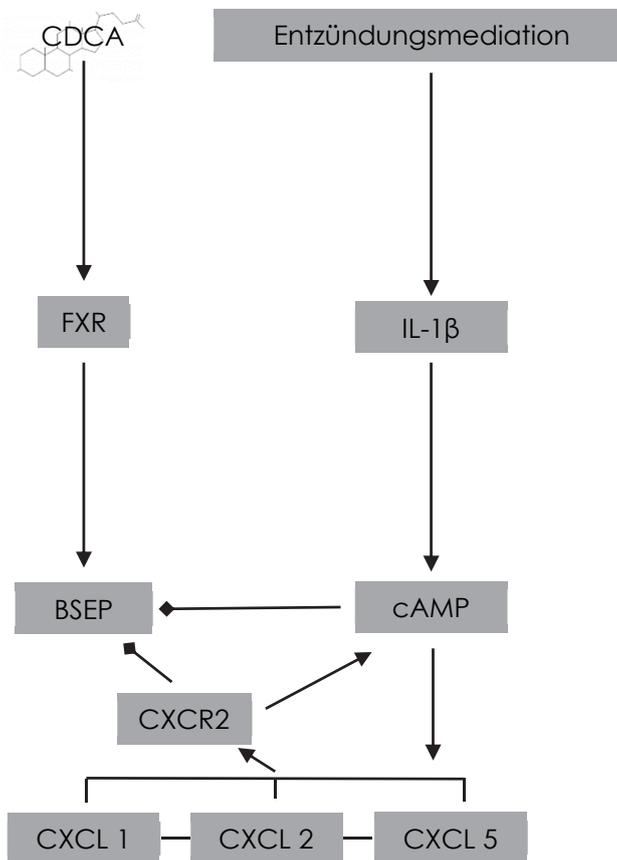


Abbildung 37 Schematische Zusammenfassung der durch IL- β ausgelösten Regulationsmechanismen zur Herabregulation des durch CDCA-induzierten BSEP Gens. Erläuterungen siehe Text (Pfeil symbolisiert die Aktivierung und Rhombus symbolisiert die Hemmung)

5 Zusammenfassung

Die Leber als zentraler Regulator multipler metabolischer Prozesse ist lebensnotwendig für die ordnungsgemäße systemische Funktion des Organismus. Eine wichtige Funktion der Leber ist die Synthese und der Transport von Gallensäuren für den effektiven Verdau von Nahrungsfetten. Eine Störung dieses Systems führt zur Akkumulation zytotoxischer Gallensäuren wie CDCA und zur Leberschädigung. Ein Transportprotein, welches in der Gallensäuren-Homöostase eine wichtige Rolle spielt, ist die Gallensäuren-Exportpumpe BSEP, deren Expression auf transkriptioneller Ebene insbesondere durch den Transkriptionsfaktor FXR reguliert wird.

Im Rahmen der Sepsis kann es zu einer empfindlichen Störung des Gallensäuren-Exports kommen. Eine Reihe von Arbeiten belegen, dass hierfür insbesondere pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-1 β und TNFa verantwortlich sind. Hierbei wird die Oberflächenexpression von Transportproteinen wie BSEP auf verschiedenen Ebenen durch pro-inflammatorische Zytokine herabreguliert. Dies beinhaltet den Ausbau des Transportproteins aus der kanalikulären Membran, den Abbau desselben sowie auf transkriptioneller Ebene die Hemmung der durch Gallensäuren-induzierte Neusynthese.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der weitergehenden Charakterisierung der molekularen Mechanismen, über die das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β die Gallensäuren-induzierte Expression des BSEP Gens hemmt und hierbei insbesondere mit der Frage, inwieweit autokrine Mechanismen involviert sind. Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass für den inhibitorischen Effekt von IL-1 β auf die Expression des BSEP Gens die Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR2 essentiell ist. Weiterführende Untersuchungen legen nahe, dass für den inhibitorischen Einfluss von CXCR2 auf die BSEP Expression die CXCR2-vermittelte Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration relevant ist. Hiermit übereinstimmend führt die Hemmung der Aktivierung von CXCR2 durch einen spezifischen Inhibitor zu einer nahezu vollständigen Aufhebung des inhibitorischen Effekts von IL-1 β auf die Gallensäuren-induzierte Expression des BSEP Gens, wie auch zu einer Hemmung der IL-1 β -induzierten Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Überlegung, dass die durch IL-1 β -induzierte, CXCR2-abhängige Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration für die Hemmung der transkriptionellen Heraufregulation des BSEP Gens relevant ist, wird ferner durch die

Tatsache gestützt, dass eine Anhebung der intrazellulären cAMP-Konzentration, durch Hemmung der Phosphodiesterasen, Aktivierung der Adenylylzyklen oder Verwendung synthetischer cAMP-Analoga, ebenfalls zu einer Aufhebung der Gallensäuren-induzierten Expression des BSEP Gens führt. Dass IL-1 β zu einer deutlichen Heraufregulation von CXCR2 Liganden wie CXCL 1, 2 und 5 führt, belegen *screening* Experimente unter Verwendung von RNA und Protein Arrays, wobei diese deutlich machen, dass murine Hepatozyten in Reaktion auf IL-1 β ein breites Spektrum an Chemokinen exprimieren. Die hier vorgelegte Arbeit lässt zusammenfassend folgern, dass die Hemmung der Gallensäuren-induzierten, transkriptionellen Heraufregulation des BSEP Gens durch IL-1 β nicht direkt erfolgt, sondern indirekt über autokrine CXCR2- und cAMP-abhängige Regulationsmechanismen.

6 Summary

The liver as central regulator of multiple metabolic processes is indispensable for proper systemic function and survival. One important function is the synthesis and transport of bile acids for lipid digestion and adsorption. The malfunction of this machinery leads to accumulation of cytotoxic bile acids such as CDCA and a subsequent severe damage of the liver.

Proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α have been identified as critical factors for the impaired export of bile acids under septic conditions. Surface expression of transport proteins such as BSEP is down regulated due to action of proinflammatory cytokines. The different levels of regulation involve removal of the protein from the canalicular membrane, degradation, and inhibition of bile acid induced gene transcription. The molecular mechanisms, which are responsible for down-regulation of BSEP gene expression by inflammatory factors are incompletely understood. Therefore the present study aimed to further characterize the molecular mechanisms involved in IL-1 β mediated down-regulation of bile acid induced BSEP gene expression and the putative involvement of autocrine signaling mechanisms thereby. The results proof chemokine receptor CXCR2 to be essential for IL-1 β induced down-regulation of the BSEP gene by increasing intracellular accumulation of cAMP. Matching results were achieved by selective inhibition of CXCR2 resulting in subsequent suspension of the inhibitory effect of IL-1 β on bile acid stimulated BSEP gene expression and down-regulation of IL-1 β stimulated intracellular cAMP concentration. Assuming IL-1 β induced and CXCR2 dependent regulation of intracellular cAMP concentration to be crucial for inhibition of bile acid induced BSEP gene expression, experiments were performed to elevate intracellular cAMP levels and the results supported the inhibitory effect of cAMP on BSEP expression. Screening experiments on RNA and protein levels of primary murine hepatocytes revealed a broad increase in chemokine expression and a distinct up-regulation of ligands for CXCR2 upon exposure to IL-1 β . In conclusion the data suggest that the inhibitory effect of IL-1 β on bile acid induced BSEP gene expression is transduced indirectly due to cAMP and CXCR2 dependent autocrine signaling mechanisms.

7 Anhang

Tabelle 9 Belegung des RT² Chemokine Arrays von Qiagen

Position	GenBank	Symbol	Beschreibung
A01	NM_007577	C5ar1	Complement component 5a receptor 1
A02	NM_021609	Ackr2	Chemokine binding protein 2
A03	NM_011329	Ccl1	Chemokine (C-C motif) ligand 1
A04	NM_011330	Ccl11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
A05	NM_011331	Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12
A06	NM_011332	Ccl17	Chemokine (C-C motif) ligand 17
A07	NM_011888	Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
A08	NM_011333	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A09	NM_016960	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
A10	NM_009137	Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
A11	NM_019577	Ccl24	Chemokine (C-C motif) ligand 24
A12	NM_009138	Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25
B01	NM_001013412	Ccl26	Chemokine (C-C motif) ligand 26
B02	NM_020279	Ccl28	Chemokine (C-C motif) ligand 28
B03	NM_011337	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
B04	NM_013652	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
B05	NM_013653	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
B06	NM_009139	Ccl6	Chemokine (C-C motif) ligand 6
B07	NM_013654	Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
B08	NM_021443	Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8
B09	NM_011338	Ccl9	Chemokine (C-C motif) ligand 9
B10	NM_009912	Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
B11	NM_007721	Ccr10	Chemokine (C-C motif) receptor 10
B12	NM_007718	Ccr11	Chemokine (C-C motif) receptor 1-like 1
C01	NM_009915	Ccr2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
C02	NM_009914	Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3
C03	NM_009916	Ccr4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
C04	NM_009917	Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
C05	NM_009835	Ccr6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
C06	NM_007719	Ccr7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
C07	NM_007720	Ccr8	Chemokine (C-C motif) receptor 8
C08	NM_009913	Ccr9	Chemokine (C-C motif) receptor 9
C09	NM_145700	Ackr4	Chemokine (C-C motif) receptor-like 1
C10	NM_017466	Ccr12	Chemokine (C-C motif) receptor-like 2
C11	NM_008153	Cmklr1	Chemokine-like receptor 1
C12	NM_027022	Cmtm2a	CKLF-like MARVEL transmembr. domain containing 2A
D01	NM_024217	Cmtm3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
D02	NM_153582	Cmtm4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4
D03	NM_009916	Cmtm5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5
D04	NM_026036	Cmtm6	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6
D05	NM_00987	Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
D06	NM_00987	Cx3cr1	Chemokine (C-X3-C) receptor 1
D07	NM_008176	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
D08	NM_021274	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
D09	NM_019494	Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
D10	NM_021704	Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
D11	NM_018866	Cxcl13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13

D12	NM_019568	Cxcl14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
E01	NM_011339	Cxcl15	Chemokine (C-X-C motif) ligand 15
E02	NM_023158	Cxcl16	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16
E03	NM_009140	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
E04	NM_203320	Cxcl3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
E05	NM_203320	Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
E06	NM_203320	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
E07	NM_203320	Cxcr1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1
E08	NM_203320	Cxcr2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
E09	NM_009910	Cxcr3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
E10	NM_009911	Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
E11	NM_007551	Cxcr5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
E12	NM_030712	Cxcr6	Chemokine (C-X-C motif) receptor 6
F01	NM_007722	Ackr3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7
F02	NM_010045	Darc	Duffy blood group, chemokine receptor
F03	NM_001352	Fpr1	Formyl peptide receptor 1
F04	NM_001025381	Gpr17	G protein-coupled receptor 17
F05	NM_010431	Hif1a	Hypoxia induced factor 1, alpha subunit
F06	NM_0008337	Ifn γ	Interferon gamma
F07	NM_010551	Il16	Interleukin 16
F08	NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta
F09	NM_021283	Il4	Interleukin 4
F10	NM_031168	Il6	Interleukin 6
F11	NM_008401	Itgam	Integrin alpha M
F12	NM_008404	Itgb2	Integrin beta 2
G01	NM_011949	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1
G02	NM_011951	Mapk14	Mitogen-activated protein kinase 14
G03	NM_019932	Pf4	Platelet factor 4
G04	NM_023785	Ppbp	Pro-platelet basic protein
G05	NM_178804	Slit2	Slit homolog 2 (Drosophila)
G06	NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
G07	NM_011905	Tlr2	Toll-like receptor 2
G08	NM_021297	Tlr4	Toll-like receptor 4
G09	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor
G10	NM_138302	Tymp	Thymidine phosphorylase
G11	NM_008510	Xcl1	Chemokine (C motif) ligand 1
G12	NM_011798	Xcr1	Chemokine (C motif) receptor 1
H01	NM_007393	Actb	Actin, beta
H02	NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin
H03	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta
H05	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 α (cytosolic), class B member 1
H06	SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Literaturverzeichnis

Klinische Pathophysiologie (2006). 9., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Abbate, Antonio; Kontos, Michael Christopher; Abouzaki, Nayef Antar; Melchior, Ryan David; Thomas, Christopher; Van Tassell, Benjamin Wallace et al. (2014): Comparative Safety of Interleukin-1 Blockade With Anakinra in Patients With ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction (from the VCU-ART and VCU-ART2 Pilot Studies). In: *The American journal of cardiology*. DOI: 10.1016/j.amjcard.2014.11.003.

Aggarwal, Bharat B.; Gupta, Subash C.; Kim, Ji Hye (2012): Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. In: *Blood* 119 (3), S. 651–665. DOI: 10.1182/blood-2011-04-325225.

Akimoto, Madoka; Moleschi, Kody; Boulton, Stephen; VanSchouwen, Bryan; Selvaratnam, Rajeevan; Taylor, Susan S.; Melacini, Giuseppe (2014): Allosteric linkers in cAMP signalling. In: *Biochemical Society transactions* 42 (1), S. 139–144. DOI: 10.1042/BST20130257.

Alasbahi, Rawiya H.; Melzig, Matthias F. (2010): *Plectranthus barbatus*: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology - Part 1. In: *Planta medica* 76 (7), S. 653–661. DOI: 10.1055/s-0029-1240898.

Alberts, Bruce; Nover, Lutz (2012): *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 4., vollst. Überarb. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.

Allen, Katryn; Kim, Nam Deuk; Moon, Jeon-Ok; Copple, Bryan L. (2010): Upregulation of early growth response factor-1 by bile acids requires mitogen-activated protein kinase signaling. In: *Toxicology and applied pharmacology* 243 (1), S. 63–67. DOI: 10.1016/j.taap.2009.11.013.

Allen, Samantha J.; Crown, Susan E.; Handel, Tracy M. (2007): Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. In: *Annu Rev Immunol* 25, S. 787–820. DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529.

Alrefai, Waddah A.; Gill, Ravinder K. (2007): Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. In: *Pharm Res* 24 (10), S. 1803–1823. DOI: 10.1007/s11095-007-9289-1.

Altarejos, Judith Y.; Montminy, Marc (2011): CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (3), S. 141–151. DOI: 10.1038/nrm3072.

Ananthanarayanan, M.; Li, Yanfeng; Surapureddi, S.; Balasubramanian, N.; Ahn, Jaeyong; Goldstein, J. A.; Suchy, Frederick J. (2011): Histone H3K4 trimethylation by MLL3 as part of ASCOM complex is critical for NR activation of bile acid transporter genes and is downregulated in cholestasis. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300 (5), S. G771-81. DOI: 10.1152/ajpgi.00499.2010.

Antoni, Ferenc A. (2012): New paradigms in cAMP signalling. In: *Molecular and cellular endocrinology* 353 (1-2), S. 3–9. DOI: 10.1016/j.mce.2011.10.034.

Bailly, S.; Ferrua, B.; Fay, M.; Gougerot-Pocidallo, M. A. (1990): Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. In: *Cytokine* 2 (3), S. 205–210.

Becker, S.; Quay, J.; Koren, H. S.; Haskill, J. S. (1994): Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. In: *Am J Physiol* 266 (3 Pt 1), S. L278-86.

Bessho, Kazuhiko; Mourya, Reena; Shivakumar, Pranavkumar; Walters, Stephanie; Magee, John C.; Rao, Marepalli et al. (2014): Gene expression signature for biliary atresia and a role for interleukin-8 in pathogenesis of experimental disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (1), S. 211–223. DOI: 10.1002/hep.27045.

Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley MC, March CJ, Prickett (1988): Generation of biologically active interleukin-1b by proteolytic cleavage of the inactive precursor. In: *J Biol Chem* (263), S. 9437–9442.

Bode, Johannes G.; Albrecht, Ute; Häussinger, Dieter; Heinrich, Peter C.; Schaper, Fred (2012): Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. In: *Eur. J. Cell Biol.* 91 (6-7), S. 496–505. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.09.008.

Borst, P.; Schinkel, A. H.; Smit, J. J.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Smith, A. J. et al. (1993): Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals. In: *Pharmacol Ther* 60 (2), S. 289–299.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72, S. 248–254.

Bradley, J. R. (2008): TNF-mediated inflammatory disease. In: *J Pathol* 214 (2), S. 149–160. DOI: 10.1002/path.2287.

Calkins, Casey M.; Bensard, Denis D.; Shames, Brian D.; Pulido, Edward J.; Abraham, Edward; Fernandez, Nathan et al. (2002): IL-1 regulates in vivo C-X-C chemokine induction and neutrophil sequestration following endotoxemia. In: *J Endotoxin Res* 8 (1), S. 59–67.

Cerec, Virginie; Glaise, Denise; Garnier, Delphine; Morosan, Serban; Turlin, Bruno; Drenou, Bernard et al. (2007): Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. In: *Hepatology* 45 (4), S. 957–967. DOI: 10.1002/hep.21536.

Chandra, G.; Cogswell, J. P.; Miller, L. R.; Godlevski, M. M.; Stinnett, S. W.; Noel, S. L. et al. (1995): Cyclic AMP signaling pathways are important in IL-1 beta transcriptional regulation. In: *J Immunol* 155 (10), S. 4535–4543.

Chang, M. S.; McNinch, J.; Basu, R.; Simonet, S. (1994): Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. In: *J Biol Chem* 269 (41), S. 25277–25282.

Cheng, Xingguo; Buckley, David; Klaassen, Curtis D. (2007): Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression. In: *Biochem Pharmacol* 74 (11), S. 1665–1676. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.08.014.

Chiang, J. Y.; Kimmel, R.; Weinberger, C.; Stroup, D. (2000): Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. In: *J Biol Chem* 275 (15), S. 10918–10924.

Choi, Young Hee; Yu, Ai-Ming (2014): ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. In: *Curr Pharm Des* 20 (5), S. 793–807.

Claudiel, Thierry; Staels, Bart; Kuipers, Folkert (2005): The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (10), S. 2020–2030. DOI: 10.1161/01.ATV.0000178994.21828.a7.

Claudel, Thierry; Zollner, Gernot; Wagner, Martin; Trauner, Michael (2011): Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1812 (8), S. 867–878. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.12.021.

Cole, Susan P C (2014): Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a "Multitasking" ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. In: *J Biol Chem* 289 (45), S. 30880–30888. DOI: 10.1074/jbc.R114.609248.

Crispe, Ian Nicholas (2009): The liver as a lymphoid organ. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27, S. 147–163. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132629.

Crocenzi, Fernando A.; Basiglio, Cecilia L.; Perez, Leonardo M.; Portesio, Maria S.; Pozzi, Enrique J Sanchez; Roma, Marcelo G. (2005): Silibinin prevents cholestasis-associated retrieval of the bile salt export pump, Bsep, in isolated rat hepatocyte couplets: possible involvement of cAMP. In: *Biochem Pharmacol* 69 (7), S. 1113–1120. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.01.009.

Curnock, Adam P.; Logan, Marisa K.; Ward, Stephen G. (2002): Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. In: *Immunology* 105 (2), S. 125–136. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2002.01345.x.

Dancygier, Henryk (2010): Clinical hepatology. Principles and practice of hepatobiliary diseases. Heidelberg u.a.: Springer.

Dancygier, Henryk; Allescher, Hans-Dieter (2003): Klinische Hepatologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen ; mit 257 Tabellen. Berlin [u.a.]: Springer.

Defer, N.; Best-Belpomme, M.; Hanoune, J. (2000): Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 279 (3), S. F400-16.

Devalaraja, R. M.; Nanney, L. B.; Du, J.; Qian, Q.; Yu, Y.; Devalaraja, M. N.; Richmond, A. (2000): Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. In: *J Invest Dermatol* 115 (2), S. 234–244. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00034.x.

Diao, Lei; Li, Na; Brayman, Timothy G.; Hotz, Kathy J.; Lai, Yurong (2010): Regulation of MRP2/ABCC2 and BSEP/ABCB11 expression in sandwich cultured human and rat hepatocytes exposed to inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-1 β . In: *The Journal of biological chemistry* 285 (41), S. 31185–31192. DOI: 10.1074/jbc.M110.107805.

Dinarello, Charles A. (2013): Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. In: *Seminars in immunology* 25 (6), S. 389–393. DOI: 10.1016/j.smim.2013.10.001.

Dold, S.; Laschke, M. W.; Lavasani, S.; Menger, M. D.; Jeppsson, B.; Thorlacius, H. (2009): Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. In: *British journal of pharmacology* 156 (3), S. 466–474. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2008.00043.x.

Donner, Markus G.; Schumacher, Stephanie; Warskulat, Ulrich; Heinemann, Jane; Haussinger, Dieter (2007): Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293 (6), S. G1134-46. DOI: 10.1152/ajpgi.00079.2007.

Dufour, Jean-François; Clavien, Pierre-Alain (2005): Signaling pathways in liver diseases. Berlin, New York: Springer.

Edwards, Peter A.; Kast, Heidi R.; Anisfeld, Andrew M. (2002): BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. In: *J Lipid Res* 43 (1), S. 2–12.

Ehltling, Christian; Lai, Wi S.; Schaper, Fred; Brenndorfer, Erwin D.; Matthes, Raphaela-Jessica; Heinrich, Peter C. et al. (2007): Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. In: *J Immunol* 178 (5), S. 2813–2826.

Elferink, Ronald Oude; Groen, Albert K. (2002): Genetic defects in hepatobiliary transport. In: *Biochim Biophys Acta* 1586 (2), S. 129–145.

Elferink, Marieke G L; Olinga, Peter; Draaisma, Annelies L.; Merema, Marjolijn T.; Faber, Klaas Nico; Slooff, Maarten J H et al. (2004): LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to a posttranscriptional process. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287 (5), S. G1008-16. DOI: 10.1152/ajpgi.00071.2004.

Emery, Paul; Fleischmann, Roy M.; Moreland, Larry W.; Hsia, Elizabeth C.; Strusberg, Ingrid; Durez, Patrick et al. (2009): Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naive patients with active rheumatoid arthritis: twenty-four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of golimumab before methotrexate as first-line therapy for early-onset rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (8), S. 2272–2283. DOI: 10.1002/art.24638.

Everett, Logan J.; Le Lay, John; Lukovac, Sabina; Bernstein, Diana; Steger, David J.; Lazar, Mitchell A.; Kaestner, Klaus H. (2013): Integrative genomic analysis of CREB defines a critical role for transcription factor networks in mediating the fed/fasted switch in liver. In: *BMC genomics* 14, S. 337. DOI: 10.1186/1471-2164-14-337.

Fang, Che; Yoon, Seokjoo; Tindberg, Niclas; Jarvelainen, Harri A.; Lindros, Kai O.; Ingelman-Sundberg, Magnus (2004): Hepatic expression of multiple acute phase proteins and down-regulation of nuclear receptors after acute endotoxin exposure. In: *Biochem Pharmacol* 67 (7), S. 1389–1397. DOI: 10.1016/j.bcp.2003.12.012.

Feldman, A. M. (2002): Adenylyl Cyclase: A New Target for Heart Failure Therapeutics. In: *Circulation* 105 (16), S. 1876–1878. DOI: 10.1161/01.CIR.0000016965.24080.12.

Feng, Wei Guo; Wang, Yi Bing; Zhang, Jin Song; Wang, Xing Yu; Li, Chang Lin; Chang, Zong Liang (2002): cAMP elevators inhibit LPS-induced IL-12 p40 expression by interfering with phosphorylation of p38 MAPK in murine peritoneal macrophages. In: *Cell Res* 12 (5-6), S. 331–337. DOI: 10.1038/sj.cr.7290135.

Fernandez, Elias J.; Lolis, Elias (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, S. 469–499. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838.

Fiebig, Teresa; Boll, Hanne; Figueiredo, Giovanna; Kerl, Hans Ulrich; Nittka, Stefanie; Groden, Christoph et al. (2012): Three-dimensional in vivo imaging of the murine liver: a micro-computed tomography-based anatomical study. In: *PLoS ONE* 7 (2), S. e31179. DOI: 10.1371/journal.pone.0031179.

Fiorucci, Stefano; Rizzo, Gianni; Donini, Annibale; Distrutti, Eleonora; Santucci, Luca (2007): Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. In: *Trends Mol Med* 13 (7), S. 298–309. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.06.001.

Fyhrquist, Nanna; Matikainen, Sampsa; Lauerma, Antti (2010): MK2 signaling: lessons on tissue specificity in modulation of inflammation. In: *The Journal of investigative dermatology* 130 (2), S. 342–344. DOI: 10.1038/jid.2009.372.

Gancedo, Juana M. (2013): Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. In: *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 88 (3), S. 645–668. DOI: 10.1111/brv.12020.

Geier, Andreas; Dietrich, Christoph G.; Voigt, Sebastian; Kim, Suk-Kyum; Gerloff, Thomas; Kullak-Ublick, Gerd A. et al. (2003): Effects of proinflammatory cytokines on rat organic

anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. In: *Hepatology* 38 (2), S. 345–354. DOI: 10.1053/jhep.2003.50317.

Geier, Andreas; Fickert, Peter; Trauner, Michael (2006): Mechanisms of disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis. In: *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3 (10), S. 574–585. DOI: 10.1038/ncpgasthep0602.

Gerloff, Thomas; Geier, Andreas; Roots, Ivar; Meier, Peter J.; Gartung, Carsten (2002): Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. In: *Eur J Biochem* 269 (14), S. 3495–3503.

Gillitzer, R.; Goebeler, M. (2001): Chemokines in cutaneous wound healing. In: *J Leukoc Biol* 69 (4), S. 513–521.

Godoy, Patricio; Lakkapamu, Sumathi; Schug, Markus; Bauer, Alexander; Stewart, Joanna D.; Bedawi, Essam et al. (2010): Dexamethasone-dependent versus -independent markers of epithelial to mesenchymal transition in primary hepatocytes. In: *Biological chemistry* 391 (1), S. 73–83. DOI: 10.1515/BC.2010.010.

Goodwin, B.; Jones, S. A.; Price, R. R.; Watson, M. A.; McKee, D. D.; Moore, L. B. et al. (2000): A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. In: *Mol Cell* 6 (3), S. 517–526.

Green, R. M.; Beier, D.; Gollan, J. L. (1996): Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. In: *Gastroenterology* 111 (1), S. 193–198.

Green, R. M.; Whiting, J. F.; Rosenbluth, A. B.; Beier, D.; Gollan, J. L. (1994): Interleukin-6 inhibits hepatocyte taurocholate uptake and sodium-potassium-adenosinetriphosphatase activity. In: *Am J Physiol* 267 (6 Pt 1), S. G1094-100.

Gripon, Philippe; Rumin, Sylvie; Urban, Stephan; Le Seyec, Jacques; Glaise, Denise; Canie, Isabelle et al. (2002): Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24), S. 15655–15660. DOI: 10.1073/pnas.232137699.

Hanauer, Stephen B.; Sandborn, William J.; Rutgeerts, Paul; Fedorak, Richard N.; Lukas, Milan; MacIntosh, Donald et al. (2006): Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. In: *Gastroenterology* 130 (2), S. 323-33; quiz 591. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.11.030.

Hanoune, J.; Defer, N. (2001): Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, S. 145–174. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145.

Hartmann, G.; Kim, H.; Piquette-Miller, M. (2001): Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. In: *Int Immunopharmacol* 1 (2), S. 189–199.

Hartmann, Georgy; Cheung, Annie K Y; Piquette-Miller, Micheline (2002): Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. In: *J Pharmacol Exp Ther* 303 (1), S. 273–281. DOI: 10.1124/jpet.102.039404.

Haussinger, D.; Schmitt, M.; Weiergraber, O.; Kubitz, R. (2000): Short-term regulation of canalicular transport. In: *Semin Liver Dis* 20 (3), S. 307–321.

Häussinger, Dieter; Kubitz, Ralf; Reinehr, Roland; Bode, Johannes G.; Schliess, Freimut (2004): Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. In: *Molecular Aspects of Medicine* 25 (3), S. 221–360. DOI: 10.1016/j.mam.2004.02.001.

Hertz, Angie L.; Bender, Andrew T.; Smith, Kimberly C.; Gilchrist, Mark; Amieux, Paul S.; Aderem, Alan; Beavo, Joseph A. (2009): Elevated cyclic AMP and PDE4 inhibition induce chemokine expression in human monocyte-derived macrophages. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51), S. 21978–21983. DOI: 10.1073/pnas.0911684106.

Hillaire, Sophie (1995): Effects of Ursodeoxycholic Acid and Chenodeoxycholic Acid on Human Hepatocytes in Primary Culture.

Hitti, Edward; Iakovleva, Tatiana; Brook, Matthew; Deppenmeier, Stefanie; Gruber, Achim D.; Radzioch, Danuta et al. (2006): Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. In: *Mol Cell Biol* 26 (6), S. 2399–2407. DOI: 10.1128/MCB.26.6.2399-2407.2006.

Hong, Guiying; Zhang, Baochun; Harbrecht, Brian G. (2010): Cyclic AMP inhibits IL-1beta plus IFNgamma-induced NF-kappaB translocation in hepatocytes by a PKA independent mechanism. In: *The Journal of surgical research* 159 (1), S. 565–571. DOI: 10.1016/j.jss.2008.12.018.

Hsueh, Y. P.; Lai, M. Z. (1995): c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase is sensitive to cAMP inhibition in T lymphocytes. In: *J Biol Chem* 270 (30), S. 18094–18098.

Huber, Reid M.; Murphy, Kathleen; Miao, Bowman; Link, John R.; Cunningham, Mark R.; Rupar, Mark J. et al. (2002): Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. In: *Gene* 290 (1-2), S. 35–43.

Huppelsberg, J.; Walter, K. (2009): *Kurzlehrbuch Physiologie: 42 Tabellen*: Thieme. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=ZG5USXiO63QC>.

Iida, N.; Grotendorst, G. R. (1990): Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. In: *Mol Cell Biol* 10 (10), S. 5596–5599.

Johnston, B.; Burns, A. R.; Suematsu, M.; Issekutz, T. B.; Woodman, R. C.; Kubes, P. (1999): Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. In: *J Clin Invest* 103 (9), S. 1269–1276. DOI: 10.1172/JCI5208.

Kanebratt, Kajsa P.; Andersson, Tommy B. (2008): HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. In: *Drug Metab Dispos* 36 (1), S. 137–145. DOI: 10.1124/dmd.107.017418.

Kim, Nam Deuk; Moon, Jeon-Ok; Slitt, Angela L.; Copple, Bryan L. (2006): Early growth response factor-1 is critical for cholestatic liver injury. In: *Toxicol Sci* 90 (2), S. 586–595. DOI: 10.1093/toxsci/kfj111.

Kipp, H.; Arias, I. M. (2000): Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. In: *J Biol Chem* 275 (21), S. 15917–15925. DOI: 10.1074/jbc.M909875199.

Klaassen, Curtis D.; Reisman, Scott A. (2010): Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 244 (1), S. 57–65. DOI: 10.1016/j.taap.2010.01.013.

Kok, Tineke; Hulzebos, Christian V.; Wolters, Henk; Havinga, Rick; Agellon, Luis B.; Stellaard, Frans et al. (2003): Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. In: *J Biol Chem* 278 (43), S. 41930–41937. DOI: 10.1074/jbc.M306309200.

Kool, M.; van der Linden, M; Haas, M. de; Scheffer, G. L.; de Vree, J M; Smith, A. J. et al. (1999): MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (12), S. 6914–6919.

Kosters, Astrid; Karpen, Saul J. (2010): The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects. In: *Seminars in liver disease* 30 (2), S. 186–194. DOI: 10.1055/s-0030-1253227.

Kosters, Astrid; White, Damara D.; Sun, Hongdan; Thevananther, Sundararajah; Karpen, Saul J. (2009): Redundant roles for cJun-N-terminal kinase 1 and 2 in interleukin-1beta-mediated reduction and modification of murine hepatic nuclear retinoid X receptor alpha. In: *Journal of hepatology* 51 (5), S. 898–908. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.06.029.

Kremer, Andreas E.; Bolier, Ruth; Dixon, Peter H.; Geenes, Victoria; Chambers, Jenny; Tolenaars, Dagmar et al. (2014): Autotaxin Activity has a high Accuracy to diagnose Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. In: *Journal of hepatology*. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.041.

Kubitz, Ralf; Dröge, Carola; Stindt, Jan; Weissenberger, Katrin; Häussinger, Dieter (2012): The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. In: *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36 (6), S. 536–553. DOI: 10.1016/j.clinre.2012.06.006.

Kubitz, Ralf; Sutfels, Gerrit; Kuhlkamp, Thomas; Kolling, Ralf; Haussinger, Dieter (2004): Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. In: *Gastroenterology* 126 (2), S. 541–553.

Kuboki, Satoshi; Shin, Thomas; Huber, Nadine; Eismann, Thorsten; Galloway, Elizabeth; Schuster, Rebecca et al. (2008): Hepatocyte signaling through CXC chemokine receptor-2 is detrimental to liver recovery after ischemia/reperfusion in mice. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (4), S. 1213–1223. DOI: 10.1002/hep.22471.

Kullak-Ublick, G. A.; Beuers, U.; Paumgartner, G. (2000a): Hepatobiliary transport. In: *J Hepatol* 32 (1 Suppl), S. 3–18.

Kullak-Ublick, G. A.; Stieger, B.; Hagenbuch, B.; Meier, P. J. (2000b): Hepatic transport of bile salts. In: *Semin Liver Dis* 20 (3), S. 273–292. DOI: 10.1055/s-2000-9426.

Kullak-Ublick, Gerd A.; Stieger, Bruno; Meier, Peter J. (2004): Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. In: *Gastroenterology* 126 (1), S. 322–342.

Kurz, A. K.; Graf, D.; Schmitt, M.; Vom Dahl, S.; Haussinger, D. (2001): Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. In: *Gastroenterology* 121 (2), S. 407–419.

Kusuhara, Hiroyuki; Sugiyama, Yuichi (2007): ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). In: *Pflugers Arch* 453 (5), S. 735–744. DOI: 10.1007/s00424-006-0134-x.

Laffitte, B. A.; Kast, H. R.; Nguyen, C. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; Edwards, P. A. (2000): Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. In: *J Biol Chem* 275 (14), S. 10638–10647.

Laishes, B. A.; Williams, G. M. (1976): Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology. In: *In Vitro* 12 (12), S. 821–832.

Lammert, F.; Wang, D. Q.; Paigen, B.; Carey, M. C. (1999): Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: integrated activities of hepatic lipid regulatory enzymes. In: *J Lipid Res* 40 (11), S. 2080–2090.

Lang, R.; Heeg, K. (1998): Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. In: *Inflammopharmacology* 6 (4), S. 297–309. DOI: 10.1007/s10787-998-0014-4.

Le Vee, Marc; Gripon, Philippe; Stieger, Bruno; Fardel, Olivier (2008): Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta. In: *Drug Metab Dispos* 36 (2), S. 217–222. DOI: 10.1124/dmd.107.016907.

Le Vee, Marc; Jigorel, Emilie; Glaise, Denise; Gripon, Philippe; Guguen-Guillouzo, Christiane; Fardel, Olivier (2006): Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. In: *Eur J Pharm Sci* 28 (1-2), S. 109–117. DOI: 10.1016/j.ejps.2006.01.004.

Le Vee, Marc; Lecureur, Valérie; Stieger, Bruno; Fardel, Olivier (2009): Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. In: *Drug Metab. Dispos.* 37 (3), S. 685–693. DOI: 10.1124/dmd.108.023630.

Le Vee, Marc; Noel, Gregory; Jouan, Elodie; Stieger, Bruno; Fardel, Olivier (2013): Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. In: *Toxicol In Vitro* 27 (6), S. 1979–1986. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.07.003.

Lew, Jane-L; Zhao, Annie; Yu, Jinghua; Huang, Li; Pedro, Nuria de; Pelaez, Fernando et al. (2004): The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. In: *J Biol Chem* 279 (10), S. 8856–8861. DOI: 10.1074/jbc.M306422200.

Li, Xiang; Klintman, Daniel; Liu, Qing; Sato, Tohru; Jeppsson, Bengt; Thorlacius, Henrik (2004): Critical role of CXC chemokines in endotoxemic liver injury in mice. In: *J Leukoc Biol* 75 (3), S. 443–452. DOI: 10.1189/jlb.0603297.

Lickteig, Andrew J.; Slitt, Angela L.; Arkan, Melek C.; Karin, Michael; Cherrington, Nathan J. (2007): Differential regulation of hepatic transporters in the absence of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and nuclear factor-kappaB in two models of cholestasis. In: *Drug Metab Dispos* 35 (3), S. 402–409. DOI: 10.1124/dmd.106.012138.

Liu, Jie; Lu, Hong; Lu, Yuan-Fu; Lei, Xiaohong; Cui, Julia Yue; Ellis, Ewa et al. (2014): Potency of individual bile acids to regulate bile acid synthesis and transport genes in primary human hepatocyte cultures. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 141 (2), S. 538–546. DOI: 10.1093/toxsci/kfu151.

Liu, Yan; Havinga, Rick; VAN DER Leij, Feike R; Boverhof, Renze; Sauer, Pieter J J; Kuipers, Folkert; Stellaard, Frans (2008): Dexamethasone exposure of neonatal rats modulates biliary lipid secretion and hepatic expression of genes controlling bile acid metabolism in adulthood without interfering with primary bile acid kinetics. In: *Pediatric research* 63 (4), S. 375–381. DOI: 10.1203/PDR.0b013e318165b8af.

Luster, M. I.; Germolec, D. R.; Yoshida, T.; Kayama, F.; Thompson, M. (1994): Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. In: *Hepatology* 19 (2), S. 480–488.

Luttringer, Olivier; Theil, Frank Peter; Lave, Thierry; Wernli-Kuratli, Karin; Guentert, Theodor W.; Saizieu, Antoine de (2002): Influence of isolation procedure, extracellular matrix and dexamethasone on the regulation of membrane transporters gene expression in rat hepatocytes. In: *Biochem Pharmacol* 64 (11), S. 1637–1650.

Maini, R.; St Clair, E W; Breedveld, F.; Furst, D.; Kalden, J.; Weisman, M. et al. (1999): Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. In: *Lancet* 354 (9194), S. 1932–1939.

Mei, Junjie; Liu, Yuhong; Dai, Ning; Hoffmann, Christian; Hudock, Kristin M.; Zhang, Peggy et al. (2012): Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (3), S. 974–986. DOI: 10.1172/JCI60588.

Meier, P. J. (1995): Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. In: *Am J Physiol* 269 (6 Pt 1), S. G801-12.

Meier, P. J.; Eckhardt, U.; Schroeder, A.; Hagenbuch, B.; Stieger, B. (1997): Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. In: *Hepatology* 26 (6), S. 1667–1677. DOI: 10.1002/hep.510260641.

Meier, Peter J.; Stieger, B. (2002): Bile salt transporters. In: *Annu Rev Physiol* 64, S. 635–661. DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.082201.100300.

Meng, Ling-Jie; Wang, Pijun; Wolkoff, Allan W.; Kim, Richard B.; Tirona, Rommel G.; Hofmann, Alan F.; Pang, K. Sandy (2002): Transport of the sulfated, amidated bile acid, sulfolithocholyltaurine, into rat hepatocytes is mediated by Oatp1 and Oatp2. In: *Hepatology* 35 (5), S. 1031–1040. DOI: 10.1053/jhep.2002.32667.

Misra, Suniti; Varticovski, Lyuba; Arias, Irwin M. (2003): Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285 (2), S. G316-24. DOI: 10.1152/ajpgi.00048.2003.

Mita, Sachiko; Suzuki, Hiroshi; Akita, Hidetaka; Stieger, Bruno; Meier, Peter J.; Hofmann, Alan F.; Sugiyama, Yuichi (2005): Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288 (1), S. G159-67. DOI: 10.1152/ajpgi.00360.2003.

Moll, Karl-Josef; Moll, Michaela (2006): Anatomie. Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. 18., überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer.

Moreau, Amélie; Le Vee, Marc; Jouan, Elodie; Parmentier, Yannick; Fardel, Olivier (2011): Drug transporter expression in human macrophages. In: *Fundam Clin Pharmacol* 25 (6), S. 743–752. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2010.00913.x.

Moreland, L. W.; Schiff, M. H.; Baumgartner, S. W.; Tindall, E. A.; Fleischmann, R. M.; Bulpitt, K. J. et al. (1999): Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. In: *Ann Intern Med* 130 (6), S. 478–486.

Mörk, Lisa-Mari; Isaksson, Bengt; Boran, Nicola; Ericzon, Bo-Göran; Strom, Stephen; Fischler, Björn; Ellis, Ewa (2012): Comparison of culture media for bile Acid transport

studies in primary human hepatocytes. In: *Journal of clinical and experimental hepatology* 2 (4), S. 315–322. DOI: 10.1016/j.jceh.2012.08.002.

Morotti, Raffaella A.; Suchy, Frederick J.; Magid, Margret S. (2011): Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) type 1, 2, and 3: a review of the liver pathology findings. In: *Seminars in liver disease* 31 (1), S. 3–10. DOI: 10.1055/s-0031-1272831.

Motoyoshi, So; Yamamoto, Yasuhiko; Munesue, Seiichi; Igawa, Hirobumi; Harashima, Ai; Saito, Hidehito et al. (2014): cAMP ameliorates inflammation by modulation of macrophage receptor for advanced glycation end-products. In: *The Biochemical journal* 463 (1), S. 75–82. DOI: 10.1042/BJ20140084.

Muller, M. (2000): Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. In: *Semin Liver Dis* 20 (3), S. 323–337.

Muller, M.; Jansen, P. L. (1997): Molecular aspects of hepatobiliary transport. In: *Am J Physiol* 272 (6 Pt 1), S. G1285-303.

Murphy, P. M.; Baggiolini, M.; Charo, I. F.; Hebert, C. A.; Horuk, R.; Matsushima, K. et al. (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. In: *Pharmacol Rev* 52 (1), S. 145–176.

Nicole Kresge Robert D. Simoni and Robert L. Hill (2005): Earl W. Sutherland's Discovery of Cyclic Adenine Monophosphate and the Second Messenger System. In: *The Journal of biological chemistry* (280).

Nies, Anne T.; Koepsell, Hermann; Winter, Stefan; Burk, Oliver; Klein, Kathrin; Kerb, Reinhold et al. (2009): Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (4), S. 1227–1240. DOI: 10.1002/hep.23103.

Noguchi, Kohji; Katayama, Kazuhiro; Sugimoto, Yoshikazu (2014): Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. In: *Pharmacogenomics and personalized medicine* 7, S. 53–64. DOI: 10.2147/PGPM.S38295.

Nolan, J. P. (1989): Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury--an idea whose time has come again. In: *Hepatology* 10 (5), S. 887–891.

Ortiz, Daniel F.; Moseley, James; Calderon, German; Swift, Amy L.; Li, Shaohua; Arias, Irwin M. (2004): Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and

regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. In: *J Biol Chem* 279 (31), S. 32761–32770. DOI: 10.1074/jbc.M404337200.

Oude Elferink, Ronald P J; Paulusma, Coen C.; Groen, Albert K. (2006): Hepatocanicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. In: *Gastroenterology* 130 (3), S. 908–925. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.08.052.

Ouyang, Xinshou; Ghani, Ayaz; Malik, Ahsan; Wilder, Tuere; Colegio, Oscar Rene; Flavell, Richard Anthony et al. (2013): Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A₂A receptor and the HIF-1 α pathway. In: *Nature communications* 4, S. 2909. DOI: 10.1038/ncomms3909.

Park, C. T.; Wright, S. D. (1996): Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. In: *J Biol Chem* 271 (30), S. 18054–18060.

Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A. et al. (1999): Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. In: *Science* 284 (5418), S. 1365–1368.

Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B. E.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M. H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. In: *Endocr Rev* 22 (2), S. 153–183. DOI: 10.1210/edrv.22.2.0428.

Perez, Leonardo M.; Milkiewicz, Piotr; Elias, Elwyn; Coleman, Roger; Sanchez Pozzi, Enrique J; Roma, Marcelo G. (2006): Oxidative stress induces internalization of the bile salt export pump, Bsep, and bile salt secretory failure in isolated rat hepatocyte couplets: a role for protein kinase C and prevention by protein kinase A. In: *Toxicol Sci* 91 (1), S. 150–158. DOI: 10.1093/toxsci/kfj113.

Persson, T.; Monsef, N.; Andersson, P.; Bjartell, A.; Malm, J.; Calafat, J.; Egesten, A. (2003): Expression of the neutrophil-activating CXC chemokine ENA-78/CXCL5 by human eosinophils. In: *Clin Exp Allergy* 33 (4), S. 531–537.

Plass, Jacqueline R M; Mol, Olaf; Heegsma, Janette; Geuken, Mariska; Faber, Klaas Nico; Jansen, Peter L M; Muller, Michael (2002): Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. In: *Hepatology* 35 (3), S. 589–596. DOI: 10.1053/jhep.2002.31724.

Popa, Calin; Netea, Mihai G.; van Riel, Piet L C M; van der Meer, Jos W M; Stalenhoef, Anton F H (2007): The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary

metabolism, and cardiovascular risk. In: *Journal of lipid research* 48 (4), S. 751–762. DOI: 10.1194/jlr.R600021-JLR200.

Pullar, Christine E.; Isseroff, R. Rivkah (2005): Cyclic AMP mediates keratinocyte directional migration in an electric field. In: *J Cell Sci* 118 (Pt 9), S. 2023–2034. DOI: 10.1242/jcs.02330.

RALL, T. W.; SUTHERLAND, E. W. (1958): Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. In: *J Biol Chem* 232 (2), S. 1065–1076.

RALL, T. W.; SUTHERLAND, E. W. (1961): The regulatory role of adenosine-3', 5'-phosphate. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 26, S. 347–354.

Ramadori, G.; Armbrust, T. (2001): Cytokines in the liver. In: *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13 (7), S. 777–784.

Rao, G. N.; Runge, M. S. (1996): Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression. In: *J Biol Chem* 271 (34), S. 20805–20810.

Reid, Glen; Wielinga, Peter; Zelcer, Noam; van der Heijden, Ingrid; Kuil, Annemieke; Haas, Marcel de et al. (2003): The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (16), S. 9244–9249. DOI: 10.1073/pnas.1033060100.

Renard, Patricia; Zachary, Marie-Denise; Bougelet, Catherine; Mirault, Marc-Edouard; Haegeman, Guy; Remacle, José; Raes, Martine (1997): Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B Activation. In: *Biochemical pharmacology* 53 (2), S. 149–160. DOI: 10.1016/S0006-2952(96)00645-4.

Rizzo, Giovanni; Renga, Barbara; Mencarelli, Andrea; Pellicciari, Roberto; Fiorucci, Stefano (2005): Role of FXR in regulating bile acid homeostasis and relevance for human diseases. In: *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5 (3), S. 289–303.

Rolo, A. P. (2000): Bile Acids Affect Liver Mitochondrial Bioenergetics: Possible Relevance for Cholestasis Therapy. In: *Toxicological Sciences* 57 (1), S. 177–185. DOI: 10.1093/toxsci/57.1.177.

Rolo, Anabela P.; Oliveira, Paulo J.; Moreno, Antonio J.; Palmeira, Carlos M. (2003): Chenodeoxycholate induction of mitochondrial permeability transition pore is associated with increased membrane fluidity and cytochrome c release: protective role of carvedilol. In: *Mitochondrion* 2 (4), S. 305–311. DOI: 10.1016/S1567-7249(03)00007-2.

Rosales, R.; Romero, M. R.; Vaquero, J.; Monte, M. J.; Requena, P.; Martinez-Augustin, O. et al. (2013): FXR-dependent and -independent interaction of glucocorticoids with the regulatory pathways involved in the control of bile acid handling by the liver. In: *Biochemical pharmacology* 85 (6), S. 829–838. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.01.001.

Rost, Daniel; Mahner, Sven; Sugiyama, Yuichi; Stremmel, Wolfgang (2002): Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 (4), S. G720-6. DOI: 10.1152/ajpgi.00318.2001.

Rowell, D. L.; Eckmann, L.; Dwinell, M. B.; Carpenter, S. P.; Raucy, J. L.; Yang, S. K.; Kagnoff, M. F. (1997): Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. In: *Am J Physiol* 273 (2 Pt 1), S. G322-32.

Russell, D. W. (1999): Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. In: *Cell* 97 (5), S. 539–542.

Sands, W. A.; Palmer, T. M. (2005): Inhibition of pro-inflammatory cytokine receptor signalling by cAMP in vascular endothelial cells. In: *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 5), S. 1126–1128. DOI: 10.1042/BST20051126.

Savarin-Vuailat, Carine; Ransohoff, Richard M. (2007): Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? In: *Neurotherapeutics* 4 (4), S. 590–601. DOI: 10.1016/j.nurt.2007.07.004.

Schiebler; Schmidt; Zilles (1999): Anatomie. 8., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Berlin [u.a.]: Springer (Springer-Lehrbuch).

Schneider Aguirre, Rebecca; Karpen, Saul J. (2013): Inflammatory mediators increase SUMOylation of retinoid X receptor α in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner in human hepatocellular carcinoma cells. In: *Molecular pharmacology* 84 (2), S. 218–226. DOI: 10.1124/mol.113.085555.

Scholmerich, J.; Becher, M. S.; Schmidt, K.; Schubert, R.; Kremer, B.; Feldhaus, S.; Gerok, W. (1984): Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties--studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. In: *Hepatology* 4 (4), S. 661–666.

Schuetz, E. G.; Strom, S.; Yasuda, K.; Lecureur, V.; Assem, M.; Brimer, C. et al. (2001a): Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear

hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. In: *J Biol Chem* 276 (42), S. 39411–39418. DOI: 10.1074/jbc.M106340200.

Schuetz, E. G.; Strom, S.; Yasuda, K.; Lecureur, V.; Assem, M.; Brimer, C. et al. (2001b): Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. In: *J Biol Chem* 276 (42), S. 39411–39418. DOI: 10.1074/jbc.M106340200.

Seger, R.; Krebs, E. G. (1995): The MAPK signaling cascade. In: *FASEB J* 9 (9), S. 726–735.

Seok, Sunmi; Fu, Ting; Choi, Sung-E; Li, Yang; Zhu, Rong; Kumar, Subodh et al. (2014): Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. In: *Nature* 516 (7529), S. 108–111. DOI: 10.1038/nature13949.

Sewnath, Miguel E.; Van Der Poll, Tom; Ten Kate, Fiebo J W; Van Noorden, Cornelis J F; Gouma, Dirk J. (2002): Interleukin-1 receptor type I gene-deficient bile duct-ligated mice are partially protected against endotoxin. In: *Hepatology* 35 (1), S. 149–158. DOI: 10.1053/jhep.2002.30272.

Shen, Hong; Zhang, Yu; Ding, Hong; Wang, Xu; Chen, Lili; Jiang, Hualiang; Shen, Xu (2008): Farnesoid X receptor induces GLUT4 expression through FXR response element in the GLUT4 promoter. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 22 (1-4), S. 1–14. DOI: 10.1159/000149779.

Sidler Pfandler, Marguerite-Anne; Hochli, Mathias; Inderbitzin, Daniel; Meier, Peter J.; Stieger, Bruno (2004): Small hepatocytes in culture develop polarized transporter expression and differentiation. In: *J Cell Sci* 117 (Pt 18), S. 4077–4087. DOI: 10.1242/jcs.01279.

Sinal, C. J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J. M.; Lambert, G.; Gonzalez, F. J. (2000a): Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. In: *Cell* 102 (6), S. 731–744.

Sinal, C. J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J. M.; Lambert, G.; Gonzalez, F. J. (2000b): Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. In: *Cell* 102 (6), S. 731–744.

Soares, João-Bruno; Pimentel-Nunes, Pedro; Roncon-Albuquerque, Roberto; Leite-Moreira, Adelino (2010): The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in

chronic liver diseases. In: *Hepatology international* 4 (4), S. 659–672. DOI: 10.1007/s12072-010-9219-x.

Sobotta, Johannes; Paulsen, Friedrich; Waschke, Jens (2010): Atlas der Anatomie des Menschen. 23. Aufl. hrsg. von F. Paulsen und J. Waschke. München: Urban und Fischer.

Song, C.; Hiipakka, R. A.; Liao, S. (2000): Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. In: *Steroids* 65 (8), S. 423–427.

Song, Kwang-Hoon; Li, Tiangang; Owsley, Erika; Strom, Stephen; Chiang, John Y L (2009): Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (1), S. 297–305. DOI: 10.1002/hep.22627.

Song, Peizhen; Rockwell, Cheryl E.; Cui, Julia Yue; Klaassen, Curtis D. (2015): Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice. In: *Toxicology and applied pharmacology* 283 (1), S. 57–64. DOI: 10.1016/j.taap.2014.12.005.

Song, Peizhen; Zhang, Youcai; Klaassen, Curtis D. (2011): Dose-response of five bile acids on serum and liver bile Acid concentrations and hepatotoxicity in mice. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 123 (2), S. 359–367. DOI: 10.1093/toxsci/kfr177.

Song, Xiulong; Kaimal, Rajani; Yan, Bingfang; Deng, Ruitang (2008): Liver receptor homolog 1 transcriptionally regulates human bile salt export pump expression. In: *Journal of lipid research* 49 (5), S. 973–984. DOI: 10.1194/jlr.M700417-JLR200.

Soroka, C. J.; Lee, J. M.; Azzaroli, F.; Boyer, J. L. (2001): Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. In: *Hepatology* 33 (4), S. 783–791. DOI: 10.1053/jhep.2001.23501.

Staudinger, J. L.; Goodwin, B.; Jones, S. A.; Hawkins-Brown, D.; MacKenzie, K. I.; LaTour, A. et al. (2001): The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6), S. 3369–3374. DOI: 10.1073/pnas.051551698.

Stayrook, Keith R.; Bramlett, Kelli S.; Savkur, Rajesh S.; Ficorilli, James; Cook, Todd; Christe, Michael E. et al. (2005): Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. In: *Endocrinology* 146 (3), S. 984–991. DOI: 10.1210/en.2004-0965.

Stieger, Bruno (2011): The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. In: *Handbook of experimental pharmacology* (201), S. 205–259. DOI: 10.1007/978-3-642-14541-4_5.

Stindt, Jan; Ellinger, Philipp; Weissenberger, Katrin; Dröge, Carola; Herebian, Diran; Mayatepek, Ertan et al. (2013): A novel mutation within a transmembrane helix of the bile salt export pump (BSEP, ABCB11) with delayed development of cirrhosis. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33 (10), S. 1527–1535. DOI: 10.1111/liv.12217.

Stork, Philip J S; Schmitt, John M. (2002): Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. In: *Trends Cell Biol* 12 (6), S. 258–266.

Strautnieks, S. S.; Kagalwalla, A. F.; Tanner, M. S.; Knisely, A. S.; Bull, L.; Freimer, N. et al. (1997): Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24. In: *Am J Hum Genet* 61 (3), S. 630–633. DOI: 10.1086/515501.

Strieter, Robert M.; Belperio, John A.; Burdick, Marie D.; Sharma, Sherven; Dubinett, Steven M.; Keane, Michael P. (2004): CXC chemokines: angiogenesis, immunoangiostasis, and metastases in lung cancer. In: *Ann N Y Acad Sci* 1028, S. 351–360. DOI: 10.1196/annals.1322.041.

Strubbe, B.; Geerts, A.; van Vlierberghe, H.; Colle, I. (2012): Progressive familial intrahepatic cholestasis and benign recurrent intrahepatic cholestasis: a review. In: *Acta Gastroenterol Belg* 75 (4), S. 405–410.

Suchy, Frederick J.; Ananthanarayanan, M. (2006): Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 Suppl 1, S. S10-6. DOI: 10.1097/01.mpg.0000226385.71859.5f.

Sun, A. Q.; Swaby, I.; Xu, S.; Suchy, F. J. (2001a): Cell-specific basolateral membrane sorting of the human liver Na(+)-dependent bile acid cotransporter. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (6), S. G1305-13.

Sun, W.; Wu, R. R.; van Poelje, P D; Erion, M. D. (2001b): Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. In: *Biochem Biophys Res Commun* 283 (2), S. 417–422. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4774.

Sung, S. S.; Walters, J. A. (1991): Increased cyclic AMP levels enhance IL-1 alpha and IL-1 beta mRNA expression and protein production in human myelomonocytic cell lines and monocytes. In: *J Clin Invest* 88 (6), S. 1915–1923. DOI: 10.1172/JC1115515.

SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. (1958): Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. In: *J Biol Chem* 232 (2), S. 1077–1091.

Szabo-Fresnais, Nicolas; Blondeau, Jean-Paul; Pomérance, Martine (2008): Activation of the cAMP pathway synergistically increases IL-1-induced IL-6 gene expression in FRTL-5 thyroid cells: involvement of AP-1 transcription factors. In: *Molecular and cellular endocrinology* 284 (1-2), S. 28–37. DOI: 10.1016/j.mce.2007.12.017.

Tan, Kah Poh; Yang, Mingdong; Ito, Shinya (2007): Activation of nuclear factor (erythroid-2 like) factor 2 by toxic bile acids provokes adaptive defense responses to enhance cell survival at the emergence of oxidative stress. In: *Molecular pharmacology* 72 (5), S. 1380–1390. DOI: 10.1124/mol.107.039370.

Thompson, R.; Strautnieks, S. (2001): BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. In: *Semin Liver Dis* 21 (4), S. 545–550. DOI: 10.1055/s-2001-19038.

Tortora, Gerard J.; Derrickson, Bryan H. (2006): Anatomie und Physiologie. Weinheim: Wiley-VCH.

Trauner, M.; Arrese, M.; Lee, H.; Boyer, J. L.; Karpen, S. J. (1998): Endotoxin downregulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors. In: *J Clin Invest* 101 (10), S. 2092–2100. DOI: 10.1172/JC11680.

Trauner, M.; Arrese, M.; Soroka, C. J.; Ananthanarayanan, M.; Koeppel, T. A.; Schlosser, S. F. et al. (1997): The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. In: *Gastroenterology* 113 (1), S. 255–264.

Trauner, Michael; Wagner, Martin; Fickert, Peter; Zollner, Gernot (2005): Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. In: *J Clin Gastroenterol* 39 (4 Suppl 2), S. S111-24.

Treuting, Piper M.; Dintzis, Suzanne M. (2012): Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas. Oxford: Academic.

Turncliff, Ryan Z.; Meier, Peter J.; Brouwer, Kim L R (2004): Effect of dexamethasone treatment on the expression and function of transport proteins in sandwich-cultured rat hepatocytes. In: *Drug Metab Dispos* 32 (8), S. 834–839.

Utili, R.; Abernathy, C. O.; Zimmerman, H. J. (1976): Cholestatic effects of Escherichia coli endotoxin on the isolated perfused rat liver. In: *Gastroenterology* 70 (2), S. 248–253.

van Erpecum, K J; Wang, D. Q.; Lammert, F.; Paigen, B.; Groen, A. K.; Carey, M. C. (2001): Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: soluble pronucleating proteins in gallbladder and hepatic biles. In: *J Hepatol* 35 (4), S. 444–451.

Verghese, M. W.; McConnell, R. T.; Strickland, A. B.; Gooding, R. C.; Stimpson, S. A.; Yarnall, D. P. et al. (1995): Differential regulation of human monocyte-derived TNF alpha and IL-1 beta by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. In: *J Pharmacol Exp Ther* 272 (3), S. 1313–1320.

Vos, T. A.; Hooiveld, G. J.; Koning, H.; Childs, S.; Meijer, D. K.; Moshage, H. et al. (1998): Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. In: *Hepatology* 28 (6), S. 1637–1644. DOI: 10.1002/hep.510280625.

Walker, W. H.; Habener, J. F. (1996): Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. In: *Trends Endocrinol Metab* 7 (4), S. 133–138.

Wang, H.; Gao, X.; Fukumoto, S.; Tademoto, S.; Sato, K.; Hirai, K. (1999): Differential expression and regulation of chemokines JE, KC, and IP-10 gene in primary cultured murine hepatocytes. In: *J Cell Physiol* 181 (2), S. 361–370. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199911)181:2<361::AID-JCP18>3.0.CO;2-9.

Wang, P.; Chaudry, I. H. (1996): Mechanism of hepatocellular dysfunction during hyperdynamic sepsis. In: *Am J Physiol* 270 (5 Pt 2), S. R927-38.

Wang, Pu; Guan, Pei-Pei; Wang, Tao; Yu, Xin; Guo, Jian-Jun; Konstantopoulos, Konstantinos; Wang, Zhan-You (2014): Interleukin-1 β and cyclic AMP mediate the invasion of sheared chondrosarcoma cells via a matrix metalloproteinase-1-dependent mechanism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1843 (5), S. 923–933. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.018.

Wang, Yan-Dong; Chen, Wei-Dong; Wang, Meihua; Yu, Donna; Forman, Barry M.; Huang, Wendong (2008): Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in

hepatic inflammatory response. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (5), S. 1632–1643. DOI: 10.1002/hep.22519.

Warskulat, U.; Kubitz, R.; Wettstein, M.; Stieger, B.; Meier, P. J.; Haussinger, D. (1999): Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. In: *Biol Chem* 380 (11), S. 1273–1279. DOI: 10.1515/BC.1999.162.

Watts, Val J.; Neve, Kim A. (2005): Sensitization of adenylate cyclase by G α i/o-coupled receptors. In: *Pharmacol Ther* 106 (3), S. 405–421. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2004.12.005.

Weber, Axel; Wasiliew, Peter; Kracht, Michael (2010): Interleukin-1 (IL-1) Pathway. In: *Science Signaling* (Vol. 3, Issue 105).

Weerachayaphorn, Jittima; Cai, Shi-Ying; Soroka, Carol J.; Boyer, James L. (2009): Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 is a positive regulator of human bile salt export pump expression. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (5), S. 1588–1596. DOI: 10.1002/hep.23151.

Wei, Yang; Li, Ke; Wang, Na; Cai, Gui-Dong; Zhang, Ting; Lin, Yan et al. (2015): Activation of endogenous anti-inflammatory mediator cyclic AMP attenuates acute pyelonephritis in mice induced by uropathogenic *Escherichia coli*. In: *The American journal of pathology* 185 (2), S. 472–484. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.007.

Weinman, S. A.; Carruth, M. W.; Dawson, P. A. (1998): Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. In: *J Biol Chem* 273 (52), S. 34691–34695.

Westbom, Catherine M.; Shukla, Anurag; MacPherson, Maximilian B.; Yasewicz, Elizabeth C.; Miller, Jill M.; Beuschel, Stacie L. et al. (2014): CREB-induced inflammation is important for malignant mesothelioma growth. In: *The American journal of pathology* 184 (10), S. 2816–2827. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.06.008.

Whiting, J. F.; Green, R. M.; Rosenbluth, A. B.; Gollan, J. L. (1995): Tumor necrosis factor- α decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis. In: *Hepatology* 22 (4 Pt 1), S. 1273–1278.

Wilde, C. G.; Seilhamer, J. J.; McGrogan, M.; Ashton, N.; Snable, J. L.; Lane, J. C. et al. (1994): Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation. In: *J Biol Chem* 269 (26), S. 17411–17416.

Wolpe, S. D.; Sherry, B.; Juers, D.; Davatellis, G.; Yurt, R. W.; Cerami, A. (1989): Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (2), S. 612–616.

Yamada, S.; Otto, P. S.; Kennedy, D. L.; Whayne, T F Jr (1980): The effects of dexamethasone on metabolic activity of hepatocytes in primary monolayer culture. In: *In Vitro* 16 (7), S. 559–570.

Yoo, Hee-Doo; Lee, Yong-Bok (2011): Interplay of pharmacogenetic variations in ABCB1 transporters and cytochrome P450 enzymes. In: *Arch Pharm Res* 34 (11), S. 1817–1828. DOI: 10.1007/s12272-011-1104-1.

Zaccolo, Manuela (2009): cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. In: *British journal of pharmacology* 158 (1), S. 50–60. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00185.x.

Zaccolo, Manuela (2011): Spatial control of cAMP signalling in health and disease. In: *Current opinion in pharmacology* 11 (6), S. 649–655. DOI: 10.1016/j.coph.2011.09.014.

Zaiir, Zoulikha M.; Eloranta, Jyrki J.; Stieger, Bruno; Kullak-Ublick, Gerd A. (2008): Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. In: *Pharmacogenomics* 9 (5), S. 597–624. DOI: 10.2217/14622416.9.5.597.

Zelcer, Noam; Reid, Glen; Wielinga, Peter; Kuil, Annemieke; van der Heijden, Ingrid; Schuetz, John D.; Borst, Piet (2003a): Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). In: *Biochem J* 371 (Pt 2), S. 361–367. DOI: 10.1042/BJ20021886.

Zelcer, Noam; Saeki, Tohru; Bot, Ilse; Kuil, Annemieke; Borst, Piet (2003b): Transport of bile acids in multidrug-resistance-protein 3-overexpressing cells co-transfected with the ileal Na⁺-dependent bile-acid transporter. In: *Biochem J* 369 (Pt 1), S. 23–30. DOI: 10.1042/BJ20021081.

Zhang, Jun; Huang, Wendong; Qatanani, Mohammed; Evans, Ronald M.; Moore, David D. (2004): The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. In: *J Biol Chem* 279 (47), S. 49517–49522. DOI: 10.1074/jbc.M409041200.

Zhao, Chenqi; Hui, Weili; Fernandes, Maria J.; Poubelle, Patrice E.; Bourgoin, Sylvain G. (2014): Lysophosphatidic acid-induced IL-8 secretion involves MSK1 and MSK2 mediated

activation of CREB1 in human fibroblast-like synoviocytes. In: *Biochemical pharmacology* 90 (1), S. 62–72. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.04.012.

Zhu, Ning; Cui, Jian; Qiao, Chunxia; Li, Yan; Ma, Yuanfang; Zhang, Jiyan; Shen, Beifen (2008): cAMP modulates macrophage development by suppressing M-CSF-induced MAPKs activation. In: *Cellular & molecular immunology* 5 (2), S. 153–157. DOI: 10.1038/cmi.2008.19.

Zlotnik, A.; Yoshie, O. (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity. In: *Immunity* 12 (2), S. 121–127.

Zollner, Gernot; Fickert, Peter; Fuchsbichler, Andrea; Silbert, Dagmar; Wagner, Martin; Arbeiter, Silvia et al. (2003): Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. In: *J Hepatol* 39 (4), S. 480–488.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. *med.* Johannes Bode, unter dessen Betreuung diese Arbeit erstellt und ermöglicht wurde. Ich danke ihm sehr für das in mich gesetzte Vertrauen und seine Bereitschaft, zu jeder Zeit kritische Diskussionen zu führen, wertvolle Anregungen zu liefern und aufmunternde Worte zu finden.

Ich bedanke mich außerordentlich bei Herrn Prof. Dr. *rer. nat.* Dieter Willbold für seine Bereitschaft, als Mentor und Gutachter meine Promotion in der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Fakultät zu betreuen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. *med.* Dieter Häussinger, für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten im Rahmen meiner Promotion in den Laboren der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können und für die Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. *med.* Lang für die Bereitstellung FXR-deletierter Mäuse und bei Herrn Prof. Dr. *rer. nat.* Hengstler vom IfADo in Dortmund für die Möglichkeit, in seinem Institut die Grundtechnik der *sandwich*-Kultur erlernen zu dürfen.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen sowie lieb gewonnenen Freunden der AG Bode und den anderen Arbeitsgruppen der experimentellen Hepatologie für ihre Unterstützung.

Im Besonderen möchte ich mich bei Judith Knievel, Sanaz Spitzley, Stephanie Wolf, Carina Franek und Maximilian Hahnel bedanken. Es war mir wirklich eine Freude!

Ein großes Dankeschön geht an Petra Warnke. Eine bessere Freundin und gleichzeitige Motivationstrainerin kann sich kein gestresster Doktorand wünschen. Danke, dass du immer an mich glaubst!

Mein größter Dank geht an meine Eltern für die vorbehaltlose Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 21. Mai 2015

Leah Missing