

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Die Regulation der Plasmamembranlokalisation der Gallensalztransporter
Natrium-Taurocholat-Cotransporter (Ntcp) und *Bile salt export pump* (Bsep)
durch Glykochenodeoxycholsäure, Hyperosmolarität
und Tauroursodeoxycholsäure

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Patrick Günter Klaus Mayer
2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Gohlke

Für meine Eltern und meinen lieben Onkel Klaus

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

als Posterbeitrag

Mayer, P.G.K., Sommerfeld, A., Häussinger, D. Die Regulation des Gallensalztransporters Ntcp durch Hyperosmolarität und Tauroursodeoxycholsäure. April 2016, Symposium der medRSD 2016

in Originalarbeiten

Sommerfeld, A., **Mayer, P. G. K.**, Cantore, M., and Häussinger, D. (2015) Regulation of plasma membrane localization of the Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) by hyperosmolarity and tauroursodeoxycholate. The Journal of biological chemistry **290**, 24237–24254

Mayer, P. G. K., Qvartskhava, N., Sommerfeld, A., Görg, B., and Häussinger, D. (2019) Regulation of Plasma Membrane Localization of the Na⁺-Taurocholate Co-Transporting Polypeptide by Glycochenodeoxycholate and Tauroursodeoxycholate. Cellular physiology and biochemistry **52**, 1427–1445

Zusammenfassung Deutsch

Ging man in der Vergangenheit davon aus, dass Gallensalze lediglich detergente Moleküle sind, die für die intestinale Resorption von Cholesterol, fettlöslichen Vitaminen oder aber Lipiden benötigt werden, so ist heute bekannt, dass Gallensalze zudem als regulatorische Moleküle fungieren, die Einfluss auf zelluläre Signalwege und nukleäre Rezeptoren nehmen (1). Eine zentrale Rolle in der Gallensalzhomöostase nehmen die Gallensalztransporter in der Zellmembran der Hepatozyten ein. Bei der Regulation der Gallensalztransporter unterscheidet man zwischen Kurzzeit- und Langzeitregulation. Zu der Kurzzeitregulation zählt man z.B. den schnellen Ein- und Ausbau der Gallensalztransporter an basolateraler und kanalikulärer Membran (1-3). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Ein- und Ausbau der Gallensalztransporter Natrium-Taurocholat-Cotransporter (Ntcp) sowie *Bile salt export pump* (Bsep) in perfundierten Rattenlebern und den zugrundeliegenden Mechanismen. Untersucht wurde die Regulation der Plasmamembranlokalisation von Ntcp durch die hydrophobe Gallensäure Glykochenodeoxycholsäure (GCDC) und durch hyperosmolare Stimulation (385 mosmol/l) sowie durch die hydrophile Gallensäure Tauroursodeoxycholsäure (TUDC). Die Regulation der Plasmamembranlokalisation von Bsep wurde für GCDC und TUDC untersucht. Bisher war bekannt, dass eine Stimulation mit hyperosmolarem Medium Fyn-vermittelt zu einem Ausbau von Bsep und *Multidrug resistance-associated protein 2* (Mrp2) aus der kanalikulären Membran führt (4). Die hydrophile Gallensäure Ursodeoxycholsäure, die *in vivo* zu ihrem Taurinkonjugat TUDC umgewandelt wird, wird in der Behandlung cholestatischer Lebererkrankungen eingesetzt (5). TUDC wirkt choloretisch und führt zu einem Einbau von Bsep in die kanalikuläre Membran und wirkt einem dortigen Ausbau von Bsep und Mrp2 bei Taurolithocholsäure-induzierter Cholestase entgegen (6–8). β_1 -Integrin, die dominierende Isoform der Integrine in der Leber (9), wird durch TUDC aktiviert (10) und fungiert zudem als Osmosensor in Hepatozyten (11). Rattenlebern wurden mit hyperosmolarem Medium, GCDC und TUDC perfundiert und das Gewebe für die Immunfluoreszenzfärbung von Ntcp, Bsep, der Na^+/K^+ -ATPase sowie Zonula occludens 1 (ZO-1) aufbereitet. Die Inhibitoren wurden dem Perfusat 30 min vor Stimulationsbeginn mit den Gallensäuren zugefügt. Durch konfokale Laserscanningmikroskopie (LSM) und anschließender densitometrischer Analyse der Fluoreszenzintensität wurde die Lokalisation der Gallensalztransporter bestimmt (4 μm beidseits der Membranmitte auf einer Gesamtlänge von 8 μm). GCDC führt innerhalb von 60 min zu einem signifikanten Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran, ebenso, wie die Stimulation mit hyperosmolarem Medium innerhalb von 30 min zu einem signifikanten Ausbau von Ntcp führt. Beide Male kommt es TUDC-vermittelt innerhalb von 30 min zu einer Reinsertion von Ntcp in die basolaterale Membran. Der Reinsertion von Ntcp wirken das Integrin-hemmende Peptid *GRGDSP* und der Proteinkinase A (PKA)-Inhibitor H89 entgegen, wohingegen das Kontrollpeptid *GRADSP* die Reinsertion nicht beeinflusst (12). Die Lokalisation der Na^+/K^+ -ATPase wird durch die Stimuli nicht beeinflusst. An der kanalikulären Membran führt die 60-minütige Stimulation mit GCDC zu einer signifikanten Verbreiterung der Kanalikuli ohne Ausbau von Bsep aus der kanalikulären Membran. Unter dem Einfluss von TUDC kommt es nach 30 min durch die Aktivierung der β_1 -Integrine wiederum zu einer Verschmälerung der Kanalikuli. Der Effekt von TUDC wird durch *GRGDSP*, nicht jedoch durch *GRADSP*, das nicht die Integrinfunktion hemmende Kontrollpeptid, aufgehoben. Schlussfolgernd inhibiert die Perfusion der Leber mit GCDC und hyperosmotischem Medium die Gallensalzaufnahme an der basolateralen Membran und die Gallensalzsekretion an der kanalikulären Membran. (4). Dabei mag es sich um einen hepatozytären Schutzmechanismus handeln. TUDC entfaltet seine choloretische Wirkung durch die Aktivierung von β_1 -Integrinen und der PKA (12).

Zusammenfassung Englisch

In the past, bile acids were considered to be just detergent molecules (1). They were known to be important for the solubilization of cholesterol in the gallbladder and for stimulating the absorption of cholesterol or lipids from the intestines (1). However, during the last two decades, it has been discovered that bile acids are regulatory molecules activating specific nuclear receptors and cell signaling pathways (1). Important for maintenance of bile salt homeostasis are the bile salt transporters in liver. Differentiation between short-term and long-term regulation of bile salt transporters is needed. Part of short-term regulation is rapid insertion and removal of bile salt transporters from hepatocellular membrane of hepatocytes (1–3). The aim of this study is to examine short-term regulation of bile salt transporters Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) at the basolateral membrane and bile salt export pump (Bsep) at the canalicular membrane of hepatocytes and the underlying mechanisms under stimulation with hydrophobic bile acid glycochenodeoxycholate (GCDC), hyperosmotic stimulation (385 μmol/l) and hydrophilic bile acid taurourso-deoxycholate (TUDC). Plasma membrane localization of Ntcp was analyzed for stimulation with GCDC or hyperosmotic stimulation followed by stimulation with TUDC, while localization of Bsep was analyzed for stimulation with GCDC followed by stimulation with TUDC. Hyperosmotic liver cell shrinkage is cholestatic and induces a Fyn-dependent retrieval of Bsep and multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) from canalicular membrane (4). Hydrophilic bile acid ursodeoxycholic acid (UDCA), which *in vivo* is rapidly conjugated with taurine (TUDC), is widely used for the treatment of cholestatic disorders (5). TUDC is choleric, leads to insertion of Bsep in canalicular membrane and counteracts retrieval of Bsep and Mrp2 in taurolithocholic acid-induced cholestasis (6–8). β₁-integrin, the predominant integrin in liver (9), is activated by TUDC (10) and is involved in osmosensing in hepatocytes (11). Perfused rat livers were stimulated with hyperosmolar medium, GCDC and TUDC and liver tissue was prepared for immunofluorescence staining of Ntcp, Bsep, Na⁺/K⁺-ATPase and zonula occludens 1 (ZO-1). Inhibitors were added to perfusate 30 min before stimulation with bile acids. Stained cryosections were visualized by confocal laser scanning microscopy (LSM) followed by densitometric fluorescence intensity analysis over a thick line of 8 μm perpendicular to the membrane. GCDC leads to a significant retrieval of Ntcp from basolateral membrane within 60 min as well as hyperosmotic stimulation within 30 min. After stimulation with GCDC as well as with hyperosmolar medium, TUDC leads within 30 min to a reinsertion of Ntcp. Reinsertion is inhibited by integrin inhibitory peptide *GRGDSP* as well as by protein kinase A inhibitor H89 (12). The control peptide *GRADSP* was ineffective. At canalicular membrane, stimulation with GCDC caused within 60 min a TUDC- and β₁-integrin-sensitive canalicular dilatation without evidence for Bsep retrieval from the canalicular membrane. Taken together, the results of the present study suggest that the cholestatic bile acid GCDC inhibits the uptake as well as the secretion of bile acids by hepatocytes, which may reflect a hepatoprotective response. Further, hyperosmotic stimulation inhibits bile acid uptake. The hydrophilic bile acid TUDC exerts its choleric property by activating β₁-integrins as well as PKA.

Abkürzungsverzeichnis

Arg Arginin

ASBT Apikaler Natrium-abhängiger Gallensäuretransporter

Asp Aspartat

Bsep *Bile salt export pump* (tierischer Gallensalztransporter)

BSEP *Bile salt export pump* (humaner Gallensalztransporter)

Ca²⁺ Calcium

cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat

EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*

FAK Fokale Adhäsionskinase

GCDC Glykochenodeoxycholsäure

Gly Glycin

H89 Proteinkinase-A-Inhibitor

kDa KiloDalton

kg Kilogramm

KG Körpergewicht

mg Milligramm

min Minuten

Mrp2 *Multidrug resistance-associated protein 2* (tierischer Gallensalztransporter)

MRP2 *Multidrug resistance-associated protein 2* (humaner Gallensalztransporter)

Na⁺ Natrium

Na⁺/K⁺-ATPase Natrium-Kalium-ATPase

NO Stickstoffmonoxid

norUDCA 24-Norursodeoxycholsäure

Ntcp Natrium-Taurocholat-Cotransporter (tierischer Gallensalztransporter)

NTCP Natrium-Taurocholat-Cotransporter (humaner Gallensalztransporter)

OCA Obeticholsäure

PBC Primär biliäre Cholangitis

PI3K Phosphoinositid-3-Kinase

PKA Proteinkinase A

PKC δ Proteinkinase C δ

PKC ζ Proteinkinase C ζ

PKC λ Proteinkinase C λ

PPAR Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

PP2B Protein-Phosphatase 2B

PSC Primäre sklerosierende Cholangitis

PXR Pregnan-X-Rezeptor

ROS Reaktive Sauerstoffspezies

SR-SIM *Superresolution structured illumination microscopy*

TC Taurocholat

TCDC Taurochenodeoxycholsäure

TLC Tauroolithocholsäure

TUDC Tauroursodeoxycholsäure

UDCA Ursodeoxycholsäure

UE Untereinheit

ZO-1 *zonula occludens 1*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der enterohepatische Kreislauf der Gallensalze	2
1.2	Klinische Einteilung und Krankheitsbild der Cholestase	3
1.3	Therapie der Cholestase mit Ursodeoxycholsäure.....	4
1.4	Aufbau des Hepatozyten	4
1.5	Der Gallensalztransporter NTCP/Ntcp	6
1.6	Der Gallensalztransporter BSEP/Bsep.....	8
1.7	Osmotische Regulation von Gallensalztransportern.....	9
1.8	Integrine	11
1.8.1	Struktur der Integrine.....	11
1.8.2	Signalübertragung durch Integrine	11
1.8.3	$\alpha_5\beta_1$ -Integrine.....	12
1.9	Zielsetzung.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte.....	14
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	14
2.1.3	Reagentien	15
2.1.4	Antikörper.....	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Leberperfusionen	16
2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	16
2.2.3	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	17
2.2.4	Densitometrische Analyse und Quantifizierung der Immunfluoreszenz- färbungen.....	17
2.2.5	Statistische Auswertung	21

3	Ergebnisse	22
3.1	Die Regulation der Plasmamembranlokalisation des Gallensalztransporters Ntcp durch GCDC und TUDC	22
3.1.1	GCDC führt zu einem Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran in perfundierten Rattenlebern	22
3.1.2	TUDC führt zu einem Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran nach GCDC-induziertem Ausbau	26
3.1.3	Der TUDC-induzierte Wiedereinbau von Ntcp wird durch eine Aktivierung der β_1 -Integrine vermittelt	29
3.1.4	<i>GRADSP</i> und <i>GRGDSP</i> beeinflussen den GCDC-induzierten Ausbau von Ntcp nicht	32
3.1.5	H89 verhindert den TUDC-bedingten Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran.....	35
3.2	Die Regulation der Plasmamembranlokalisation des Gallensalztransporters Bsep durch GCDC und TUDC	37
3.2.1	GCDC führt zu einer Verbreiterung des Gallekanalikus in perfundierten Rattenlebern.....	37
3.2.2	Die Gallensäure TUDC hebt den GCDC-induzierten Effekt der kanalikulären Verbreiterung auf und führt zu einer Verschmälerung des Gallekanalikus	40
3.2.3	Die TUDC-abhängige Hemmung der Verbreiterung des Gallekanalikus wird durch die Aktivierung der β_1 -Integrine vermittelt	43
3.2.4	<i>GRADSP</i> und <i>GRGDSP</i> beeinflussen die GCDC-induzierte Verbreiterung des Kanalikus nicht.....	46
3.2.5	Grafische Darstellung und statistische Auswertung der kanalikulären Breite der verschiedenen Perfusionen	49
3.3	Effekte von Hyperosmolarität (385 mosmol/l) und Tauroursodeoxycholsäure (TUDC) auf die Plasmamembranlokalisation des Gallensalztransporters Ntcp	50
3.3.1	Hyperosmolare Stimulation (385 mosmol/l) führt zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran.....	50

3.3.2	Die hydrophile Gallensäure TUDC führt zu einem Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran nach durch hyperosmolarem Perfusionsmedium induziertem Ausbau.....	54
3.3.3	Der TUDC-induzierte Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran bedarf der Aktivierung von β_1 -Integrinen in perfundierten Rattenlebern	56
4	Diskussion.....	59
4.1	Mechanismus des GCDC-induzierten Ausbaus des Gallensalztransporters Ntcp	59
4.2	Mechanismus der choloretischen Wirkung von TUDC nach GCDC- induziertem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp	61
4.3	Der Effekt von GCDC auf den Gallensalztransporter Bsep und den Gallekanalikus	63
4.4	Der Effekt von TUDC auf den Gallensalztransporter Bsep und den Gallekanalikus	64
4.5	Mechanismus des hyperosmolar bedingten Ausbaus des Gallensalztransporters Ntcp	65
4.6	Mechanismus der TUDC-vermittelten Hemmung des hyperosmolar-induzierten Ntcp-Ausbau aus der basolateralen Membran	67
4.7	Kritische Betrachtung der Eignung der Gallensäure Ursodeoxycholsäure im Rahmen der Behandlung von cholestatischen Lebererkrankungen.....	69
4.8	Ursodeoxycholsäure im Kontext weiterer choloretisch und zytoprotektiv wirkender Substanzen.....	70
5	Abbildungsverzeichnis	73
6	Literaturverzeichnis	76

1 Einleitung

Galle ist ein wässriges Sekret, das von den Hepatozyten der Leber gebildet wird und nachfolgend durch das Epithel der Gallengänge durch Absorptions- und Sekretionsvorgänge modifiziert wird (13). Die Galle gelangt posthepatisch entweder in die Gallenblase, in der sie konzentriert und gespeichert wird, oder sie wird direkt über die posthepatischen Gallengänge in das intestinale Lumen sezerniert (13). Die Galle besteht zu ca. 95% aus Wasser. Darin gelöst sind endogene Substanzen wie Gallensalze, Bilirubin, Cholesterol, Aminosäuren, Steroide, Porphyrine, Vitamine oder Schwermetalle (13). Zudem werden auch Medikamente oder andere Xenobiotika über die Galle ausgeschieden (13). Die Galle dient der Exkretion potenziell toxischer endogener und exogener lipophiler Substanzen und ist hauptverantwortlich für die Exkretion von Cholesterol (13). Unter den organisch gelösten Substanzen der Galle stellen die Gallensalze den Hauptbestandteil dar (13). Sie sind für die Verdauung und die intestinale Absorption verdaulicher Fette und fettlöslicher Vitamine unerlässlich. Weiter bewirken die Gallensalze zu 40-50% den Fluss der Galle. Dies wird als Gallensalz-abhängiger Gallefluss bezeichnet (*bile salt dependent bile flow*) (14). Die übrigen löslichen Bestandteile der Galle bewirken den Gallensalz-unabhängigen Gallefluss (*bile salt independent bile flow*). Hauptbestandteil dieses Gallensalz-unabhängigen Galleflusses ist Glutathion (14). Die Gallensalze werden in der Leber aus Cholesterol synthetisiert und gehören chemisch zu der Gruppe der Steroide (15). Bei physiologischem pH-Wert liegen die Gallensäuren überwiegend in anionischer Form als Gallensalze vor. Cholsäure und Chenodeoxycholsäure sind die prädominanten primären Gallensäuren in der Galle des Menschen (16). Typischerweise liegen diese konjugiert mit den Aminosäuren Glycin oder Taurin vor. Basierend auf dem C24-Grundgerüst unterscheidet man 48 verschiedene Gallensäuren in der Galle des Menschen (16). Unter Berücksichtigung mikrobieller Umbauprozesse im Darm sind es sogar 384 verschiedene Gallensäuren, die bisher in der humanen Galle bekannt sind (16).

1.1 Der enterohepatische Kreislauf der Gallensalze

Der Begriff enterohepatischer Kreislauf bezeichnet den Transport der in der Galle gelösten Gallensalze von der Leber in den Dünndarm und von dort aus zurück in die Leber (17).

Die in den Hepatozyten synthetisierten Gallensalze werden zunächst in die Kanalikuli sezerniert, gelangen sodann über die größeren intrahepatischen Gallengänge in den *Ductus choledochus*, von dem aus die Gallensalze entweder über den *Ductus cysticus* die Gallenblase passieren oder aber direkt über die *Papilla duodeni major* in das *Duodenum* gelangen. Etwa 90% der Gallensalze werden im *terminalen Ileum* resorbiert und gelangen über das portalvenöse Blut zurück zu der Leber. Auf hepatozytärer Ebene ist an der basolateralen Membran der Hepatozyten insbesondere der Natrium-Taurocholat-Cotransporter (NTCP) für die Aufnahme der Gallensalze aus dem portalvenösen Blut in die Hepatozyten verantwortlich (17). Die kanalikuläre Sekretion der Gallensalze wird über die *Bile Salt Export Pump* (BSEP) an der kanalikulären Membran sichergestellt (17). Der menschliche Körper enthält insgesamt etwa fünf Gramm Gallensalze. Davon werden lediglich ca. 0,5 g täglich neu gebildet. Zur Verdauung von Fetten werden jedoch 15-30 g Gallensalze benötigt, weshalb die Gallensalze etwa drei- bis sechsmal am Tag zwischen Leber und Darm zirkulieren (siehe Abb. 1).

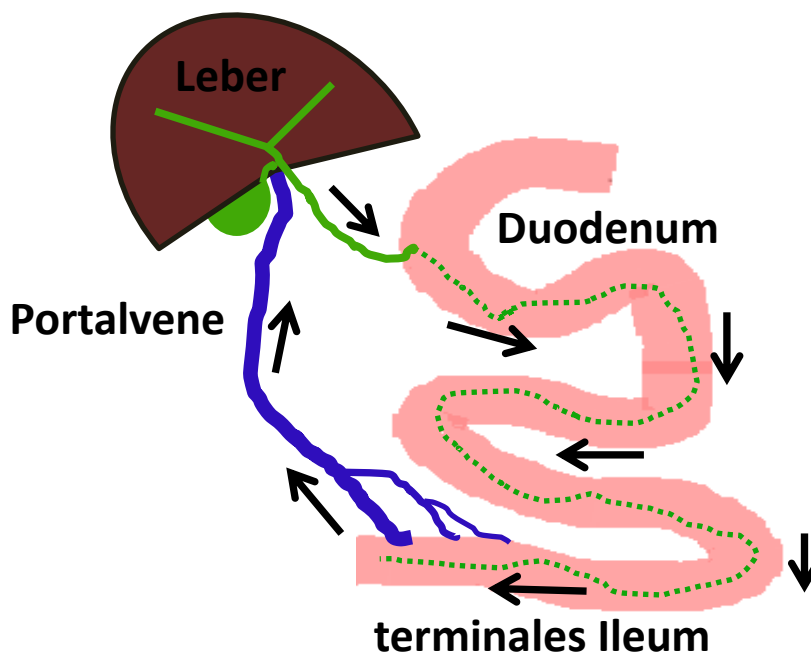


Abb. 1: Der enterohepatische Kreislauf.

Die Gallensalze zirkulieren zwischen der Leber und dem Dünndarm und werden nach Resorption in dem *terminalen Ileum* über die Portalvene wiederum der Leber zugeführt. Der enterohepatische Kreislauf wird drei- bis sechsmal pro Tag durchlaufen.

1.2 Klinische Einteilung und Krankheitsbild der Cholestase

Bei der Cholestase handelt es sich um eine Störung der Galleformation und/oder des Galleflusses (5). Klinisch unterscheidet man bei der Cholestase zwischen intra- und extrahepatischen Ursachen (siehe Abb. 2). Ein Beispiel für intrahepatische Cholestase ist ein Defekt der hepatozellulären und/oder der cholangiozellulären Gallesekretion (5). Beispiele für eine extrahepatische Cholestase sind die Obstruktion der Gallengänge durch Läsionen, Gallensteine oder aber Tumoren (5). Eine Kombination aus gestörtem Gallefluss und gestörter Gallesekretion liegt bei der primär biliären Cholangitis (PBC) und der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) vor (5). Eine Cholestase kann laborchemisch schon frühzeitig durch die Retention gallepflichtiger Substanzen im Serum diagnostiziert werden. Hinzu kommen klinische Symptome wie Ikterus, Pruritus oder aber Stuhlfärbung.

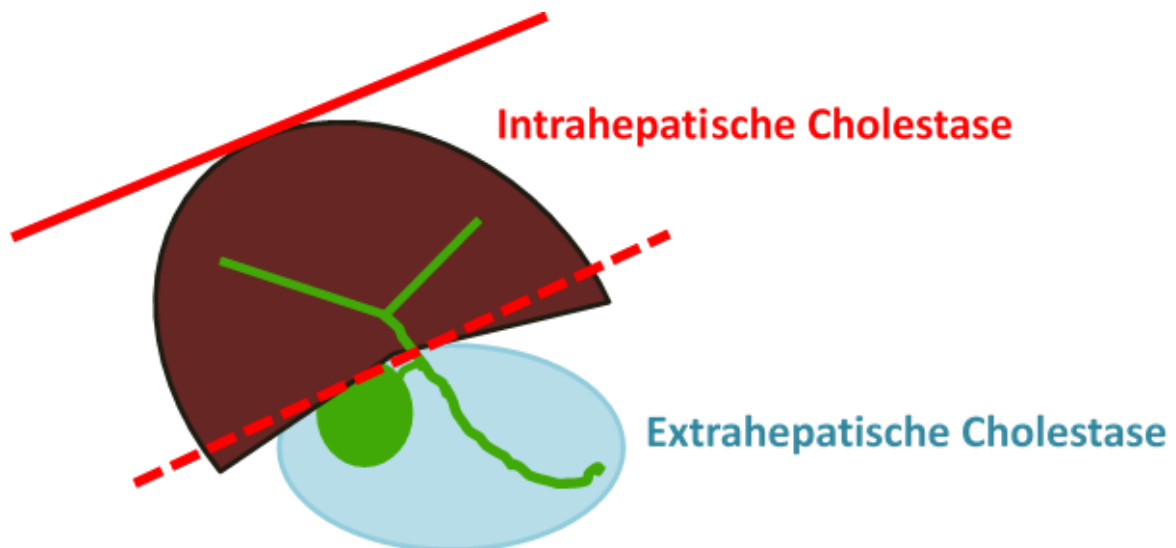


Abb. 2: Klinische Einteilung der Cholestase.

Die Cholestase lässt sich ihrer Ätiologie nach in eine intra- und eine extrahepatische Form einteilen. Während es bei der intrahepatischen Cholestase zu einer Störung der Gallesekretion und/oder des Galleflusses in der Leber kommt, handelt es sich bei der extrahepatischen Form um eine Abflussstörung der Galle in den extrahepatisch gelegenen großen Gallengängen. Auch Kombinationen sind möglich.

1.3 Therapie der Cholestase mit Ursodeoxycholsäure

Bereits zu der Zeit der Tang-Dynastie in China (618-907) wurde die getrocknete Galle von Schwarzbären zur Therapie des Ikterus eingesetzt (5). Die Galle des Schwarzbären enthält bis zu 60% Ursodeoxycholsäure (UDCA) an der Gesamtmenge der Gallensäuren (18). Die Therapie mit Hilfe von Gallensäuren nahm in der jüngeren Vergangenheit in den 1970er Jahren ihren Anfang, als zur Therapie Cholesterin-bedingter Gallensteine Chenodeoxycholsäure verwendet wurde (5). Darauf folgte der Einsatz von UDCA zur Therapie von Gallensteinen (5). Noch heute gilt die Behandlung der chronischen Cholestase mit UDCA als Therapieverfahren der ersten Wahl (5). UDCA ist eine hydrophile Gallensäure, die in der Galle des Menschen nur einen geringen Anteil an dem gesamten Gallensäurepool einnimmt (ca. 1-3%) (5). *In vivo* kommt es zu einer raschen Konjugation mit Taurin oder Glycin und es entsteht Tauroursodeoxycholsäure (TUDC) (19). UDCA findet Anwendung in der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen wie der primär biliären Cholangitis (PBC), der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) oder aber bei der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (20–22). Die Behandlung dieser chronisch fibrosierenden Cholangiopathien mit UDCA vermag zwar deren Progression zu verlangsamen, ist aber nicht in der Lage, diese zu heilen (5). Die Therapie mit UDCA wird heute allen Patienten mit PBC unter der Voraussetzung empfohlen, dass die Cholestaseparameter im Serum erhöht sind (23). Allgemein akzeptiert ist die Applikation einer Dosis von 13-15 mg/kg KG/Tag (5). Kommt es zu einem Therapieansprechen, so ist dies mit einer verbesserten Prognose assoziiert (24). Bei der Behandlung der PSC vermag UDCA die Progression der Erkrankung zu verzögern, doch Ergebnisse über die Langzeitwirkung dieser Therapie liegen derzeit nicht vor (25).

1.4 Aufbau des Hepatozyten

Der Hepatozyt ist eine polar aufgebaute Zelle. Etwa 85-90% seiner Zelloberfläche werden von der basolateralen Membran ausgebildet, die über die Lebersinusoiden mit dem portalvenösen Blut kommuniziert. 10-15% der Zelloberfläche werden von der kanalikulären Membran gebildet (13). Die kanalikulären Membranen zweier benachbarter Hepatozyten bilden dabei den Gallekanalikus aus. Abgedichtet werden die angrenzenden kanalikulären Membranen dabei durch *tight junctions* (siehe Abb. 3) (13).

In der basolateralen Membran befinden sich sekundär aktive Transportproteine, die den von der Na^+/K^+ -ATPase geschaffenen Na^+ -Gradienten für den Transport ihrer jeweiligen

Substrate ausnutzen (13). Hauptverantwortlich für die intrazelluläre Aufnahme konjugierter Gallensalze ist der Natrium-Taurocholat-Cotransporter (Ntcp) (26) (siehe Abb. 3).

Die meisten Transportproteine, die sich in der kanalikulären Membran befinden, gehören zu der ABC Superfamilie (13). Das ABC steht für *ATP binding cassette*. Diese transportieren unter der Hydrolyse von ATP Substrate gegen einen hohen Konzentrationsgradienten in die Galle (13). Hauptverantwortlich für die Sekretion von Gallensäuren aus den Hepatozyten über die kanalikuläre Membran in die Galle ist dabei die *Bile Salt Export Pump* (BSEP) (27).

Werden die Gallensalztransporter auf den folgenden Seiten mit Großbuchstaben abgekürzt, so handelt es sich um die Gallensalztransporter des Menschen. Ist hingegen lediglich der Anfangsbuchstabe groß geschrieben gefolgt von Kleinbuchstaben, so handelt es sich um die Gallensalztransporter von Tieren, in dieser Arbeit meist die der Ratte.

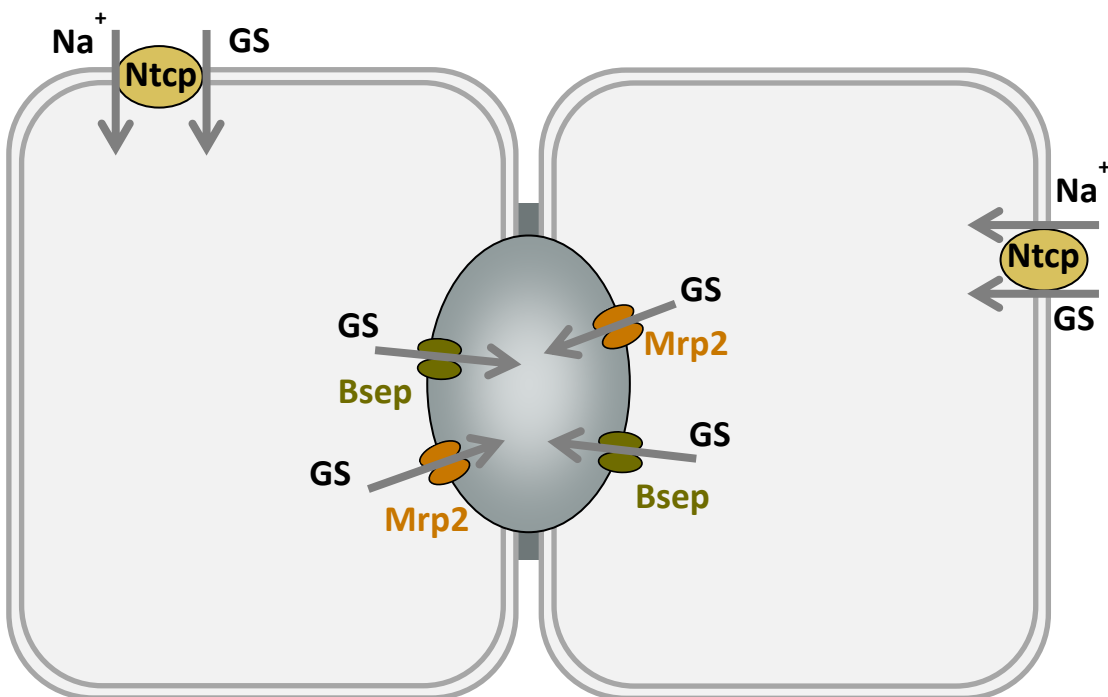


Abb. 3: Hepatobiliäre Transportproteine.

Zwei Leberparenchymzellen bilden zusammen eine sekretorische Einheit. Die basolaterale Membran wird durch *tight junctions* von der kanalikulären Membran getrennt. An der Gallensalzaufnahme ist an der basolateralen Membran insbesondere der Natrium-Taurocholat-Cotransporter (Ntcp) beteiligt. Die Gallensalzsekretion an der kanalikulären Membran wird vor allem durch die *Bile salt export pump* (Bsep) geleistet. Teilweise werden Gallensalze auch durch das kanalikuläre *Multidrug resistance-associated protein 2* (Mrp2) in die Galle transportiert.

1.5 Der Gallensalztransporter NTCP/Ntcp

Der Natrium-Taurocholat-Cotransporter (NTCP) gehört zu der Familie der SLC10A-Transporter, die Natrium-abhängig verschiedene Bestandteile der Galle transportieren (26).

Zu der SLC10A-Familie zählen sieben Transporter von SLC10A1 bis SLC10A7 (28). NTCP ist ein Polypeptid mit einer Masse von 38 kDa (29). NTCP besteht aus sieben transmembranen Domänen mit einem extrazellulär gelegenen Amino- und einem intrazellulären Carboxy-Terminus (29). Im Menschen codiert das Gen SLC10A1 für NTCP, bei Nagern ist es das Gen Slc10A1 für Ntcp (30). Es besteht eine etwa 77%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz des humanen NTCP und der des Ntcp von Nagern (28). NTCP/Ntcp befindet sich in der basolateralen Membran der Hepatozyten (31). Ntcp transportiert Natrium (Na^+)-abhängig Gallensäuren aus dem sinusoidalen Blut in die Hepatozyten. Ntcp ist ein sekundär-aktiver Transporter. Der Transport von Gallensäuren erfordert die Bindung zweier Na^+ -Moleküle (30). Den dafür nötigen Na^+ -Gradienten hält die Na^+/K^+ -ATPase aufrecht. NTCP/Ntcp transportiert sowohl konjugierte als auch unkonjugierte Gallensäuren (32). Des Weiteren transportiert NTCP/Ntcp Steroidhormone, Schilddrüsenhormone und Medikamente, wie Statine und das Antimykotikum Micafungin (33, 34). Trotz einer großen Schnittmenge an transportierten Substraten existieren auch Spezies-spezifische Substratunterschiede im Transportverhalten von NTCP/Ntcp zwischen Menschen, Ratten und Mäusen (32). So wird beispielsweise Rosuvastatin von NTCP, jedoch nicht von Ntcp transportiert (35).

Die Expression von NTCP in der basolateralen Membran kann im Rahmen von Erkrankungen der menschlichen Leber sowohl hoch- als auch herunterreguliert sein.

Lebererkrankungen mit verminderter Expression von NTCP sind die Progressive familiäre intrahepatische Cholestase (36), die inflammatorische Cholestase (37), die primäre biliäre Cholangitis (38), die chronische Hepatitis C (39) und die obstruktive Cholestase in ihrer Früh- und Spätphase (40).

Eine vermehrte Expression von NTCP lässt sich hingegen bei nicht-alkoholischer Fettleber (41) und in der terminalen Phase der primär biliären Cholangitis (42) finden.

In Abhängigkeit des Galleflusses und der darin gelösten Substanzen führen posttranskriptionelle Regulationsmechanismen zu einem schnellen Ein- und Ausbau von NTCP/Ntcp an der basolateralen Membran (30). Im Vergleich dazu läuft die transkriptionelle Regulation von NTCP/Ntcp langsam ab (29).

Cyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) führt zu einem Einbau von Ntcp in die Hepatozyten (43, 44). cAMP aktiviert hierbei die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die ihrerseits wiederum die drei Kinasen Akt, Proteinkinase C δ (PKC δ) und die Proteinkinase C ζ (PKC ζ) aktiviert (43, 45–47). Die cAMP-abhängige Aktivierung von PI3K/PKC δ und PI3K/PKC ζ lässt sich sowohl in menschlichen Hepatozyten als auch in Hepatozyten von Ratten beobachten. Es scheint, dass die Aktivierung von PI3K/PKC δ durch cAMP zu einer Aktivierung der GTPase Rab4 führt (43), die den Transport von Vesikeln beeinflusst, die NTCP enthalten. Eine membranständige Lokalisation der PKC δ scheint bei der Rab4-Aktivierung und der Translokation von NTCP an die basolaterale Membran von größerer Bedeutung zu sein als ihre Kinaseaktivität (43). Intrazellulär lokalisierte Rab4-Vesikel interagieren bei Aktivierung von Rab4 mit dem Kinesin-1 der Mikrotubuli. Das führt zu einem gesteigerten Transport der NTCP/Rab4-Vesikel in Richtung basolateraler Membran (43). Den Transport von Ntcp/Rab4-Vesikeln entlang der Mikrotubuli in Richtung deren positiv geladenem Ende stimuliert zudem die PKC ζ (48).

Ntcp ist ein Protein, welches an Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden kann (49). cAMP bewirkt eine Dephosphorylierung am Ser²²⁶ (50). cAMP steigert hierbei die intrazelluläre Calcium (Ca^{2+})-Konzentration (51) und aktiviert damit die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2B (PP2B) (52, 53). PP2B führt zu einer direkten Dephosphorylierung von Ntcp (53) und damit zu einem Einbau des Transporters in die basolaterale Membran.

Die verschiedenen PKC-Isoformen scheinen die Expression von NTCP/Ntcp in der basolateralen Membran unterschiedlich zu beeinflussen. Während die PKC δ (43) und die PKC ζ (47) zu einem Einbau von NTCP/Ntcp in die basolaterale Membran führen, bewirkt die PKC α den Ausbau von Ntcp aus der Membran (54, 55).

Es wurde gezeigt, dass auch Stickstoffmonoxid (NO) eine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Lokalisation von NTCP/Ntcp in den Hepatozyten spielt. NO bindet an die Thiolgruppe der Cysteinreste von NTCP/Ntcp. Durch diese S-Nitrosylierung kommt es zu einem Ausbau von NTCP/Ntcp aus der basolateralen Membran (56). Der NTCP besitzt vier Cysteinreste (Cys44, Cys98, Cys125, Cys266) in seiner Aminosäuresequenz, die sich auch im Ratten-Ntcp finden (57). Für den Ratten-Ntcp, der acht Cysteinreste besitzt, konnte zudem gezeigt werden, dass NO eine S-Nitrosylierung am Cys⁹⁶ auslöst, wodurch es zu einem Ausbau des Transporters aus der basolateralen Membran kommt (58). Diesem Mechanismus könnte bei der durch

Lipopolysaccharid verursachten Cholestase (Sepsis-assoziierte Cholestase) Bedeutung zukommen (59).

Weniger gut erforscht ist hingegen die durch NO bedingte Nitrierung der Tyrosinreste von NTCP/Ntcp und ihre Auswirkung auf die Lokalisation des Transporters (60).

1.6 Der Gallensalztransporter BSEP/Bsep

Die *Bile salt export pump* (Bsep) gehört zu der Superfamilie der ABC-Transporter (*ATP binding cassette*-Transporter) (13). Diese gewährleisten über die Bindung und den Verbrauch von ATP einen aktiven Transport an der kanalikulären Membran und transportieren ihre jeweiligen Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten in die Galle (13). BSEP ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 160 kDa und besteht aus zwei transmembranären Domänen mit jeweils sechs die Membran durchspannenden Helices (13). BSEP/Bsep transportiert nahezu ausschließlich Gallensalze (13) mit Ausnahme des ebenfalls durch Bsep transportierten Pravastatins (61). BSEP ist damit für den Gallensalz-abhängigen Gallefluss verantwortlich und transportiert die Gallensäuren wie Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure und Ursodeoxycholsäure sowie deren Konjugate (27). Es herrscht eine etwa 80%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen dem Bsep von Nagetieren und dem humanen BSEP (13).

Es sind eine Reihe von Mutationen des BSEP-Gens bekannt, die zu cholestatischen Lebererkrankungen führen (27). Dazu wird die Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC-2) gezählt, bei der eine stark verminderte bis fehlende Expression von BSEP in der kanalikulären Membran vorliegt (27). Klinische Folgen sind Ikterus, Pruritus, Wachstumsstörungen oder aber schwere Hämorrhagien (27). Daneben werden weniger schwer verlaufende BSEP-assoziierte cholestatische Lebererkrankungen als benigne rezidivierende intrahepatische Cholestase vom Typ 2 bezeichnet (27).

BSEP/Bsep wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene stark reguliert.

cAMP, Tauroursodeoxycholsäure, und Taurocholsäure führen zu einem Einbau von Bsep in die kanalikuläre Membran (13). Demgegenüber führen Estradiol-17 β -Glucuronid, Lithocholsäure, Lipopolysaccharide und Hypoxie zu einem Ausbau von Bsep aus der kanalikulären Membran (13).

Die Translokation der Gallensalztransporter an die kanalikuläre Membran erfolgt Mikrotubuli-vermittelt (62). Die PI3K ist in der durch Taurocholsäure induzierten Translokation von Bsep zu der kanalikulären Membran involviert und muss hierzu in aktivierter Form vorliegen (62). Die durch Zellschwellung und TUDC gesteigerte Translokation von Bsep zu der kanalikulären Membran in Rattenlebern ist hingegen von der Aktivierung der $p38^{MAPK}$ und Erk abhängig (63). Durch die Phosphorylierung von Bsep durch die PKC α kommt es zu einer gesteigerten Gallensalzsekretion, was einen vermehrten Einbau des Transporters in die Membran vermuten lässt (62). Die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteinkinase C-Isoformen durch Phorbolster oder aber Thymeleatoxin wirkt hingegen cholestatisch und führt zu einem Ausbau von Bsep aus der kanalikulären Membran (27).

Bisher ist in der Literatur relativ wenig über die Regulation von BSEP bekannt (63). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei dem durch TUDC induzierten Einbau von BSEP in die kanalikuläre Membran von HepG2-Zellen sowohl die $p38^{MAPK}$ als auch eine Ca^{2+} -unabhängige PKC-Isoform involviert sind (63). In HepG2-Zellen befindet sich BSEP partiell in dem Golgi-Apparat und Mikrotubuli sind erforderlich, damit BSEP ausgehend von dem Golgi-Apparat („Golgi-Kompartiment“) über einen intrazellulären BSEP-Pool („Post-Golgi-Kompartiment“) an die kanalikuläre Membran gelangt und dort eingebaut wird (63).

1.7 Osmotische Regulation von Gallensalztransportern

Der Ein- und Ausbau von Gallensalztransportern in die basolaterale und kanalikuläre Membran ist einer der Hauptmechanismen der sogenannten Kurzzeitregulation („*short-term regulation*“), der Einfluss auf die Formation der Galle nimmt (64). Dies ermöglicht eine rasche Anpassung der kanalikulären Sekretion an äußere Begebenheiten (64). Durch die Veränderung der Zahl der Transporter in der basolateralen und kanalikulären Membran kann die Transportkapazität (V_{max}) innerhalb weniger Minuten verändert werden (65).

Einen Einfluss auf die Kurzzeitregulation der Gallensalztransporter nimmt der Hydratationszustand der Hepatozyten, gleichzusetzen mit deren Zellvolumen (11). Auswirkung auf das Zellvolumen der Hepatozyten haben verschiedene Hormone und Nährstoffe, oxidativer Stress oder die Veränderung der Umgebungsmolarität (2). Während eine hyperosmolare Umgebung zu einer Zellschrumpfung führt, kommt es bei hypoosmolarer Umgebung zu einer Zellschwellung der Hepatozyten (2).

Diese Änderungen des Zellvolumens werden von der Zelle durch Mechanismen registriert, die man unter dem Begriff *Osmosensing* subsumiert (11).

Die sich daran anschließende Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die zu Veränderungen der Zellfunktion führt, nennt man *Osmosignalling* (11).

In perfundierten Rattenlebern führt eine Zellschrumpfung zu einer Abnahme der Exkretion des Gallensalzes Taurocholat (TC) in die Galle, während sie durch eine Schwellung der Hepatozyten gesteigert wird. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Änderung des Hydratationszustandes mittels anisotonem Stimulus, Insulin oder aber Ethanol induziert wird (64).

Eine Zunahme des Wassergehaltes von Hepatozyten um 10% führt zu einer Verdoppelung der V_{\max} der TC-Sekretion in die Galle (65). Der Hydratationszustand der Hepatozyten hat somit einen großen Einfluss auf den transzellulären Transport von in der Galle gelösten Substanzen, wie konjugierten Gallensäuren, Glucuroniden oder aber Glutathion-Konjugaten (11).

Hyperosmolare Zellschrumpfung führt zu einem schnellen Ausbau von Bsep aus der kanalikulären Membran, während eine hypoosmolare Stimulation zu einer Insertion von Bsep in die Membran führt (66).

Ebenso verhält es sich mit dem kanalikulären Transporter Mrp2. In Immunfluoreszenzfärbungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass Zellschrumpfung zu einem Ausbau des Transporters aus der Membran führt, wohingegen es bei Zellschwellung zu einem Einbau in die kanalikuläre Membran kommt (67).

Auf der mRNA-Ebene führt die hypoosmotisch bedingte Zellschwellung zu einer erhöhten Expression der mRNA von Bsep und Mrp2, wohingegen es zu einer Abnahme der mRNA-Expression durch hyperosmotisch bedingte Zellschrumpfung kommt (68).

Zellstrukturen, die Änderungen im Hydratationszustand der Hepatozyten registrieren können, sind Integrine. Sie fungieren als wichtige Osmosensoren der Hepatozyten (69).

1.8 Integrine

1.8.1 Struktur der Integrine

Integrine sind transmembrane, heterodimere Glykoproteine, die sich aus einer α -Untereinheit (120-180 kDa) und einer β -Untereinheit (90-110kDa) zusammensetzen (70). Die beiden Untereinheiten bilden eine nichtkovalente Bindung aus (70). Die Integrine bestehen aus drei Domänen, einer großen extrazellulären, einer transmembranen und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne (70). Es sind bislang 24 Integrin-Isoformen bekannt, die aus 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten gebildet werden (70). Während an die extrazelluläre Domäne spezifische Liganden binden, bindet die zytoplasmatische Domäne an das Zytoskelett im Zellinneren. Alle Integrine, mit Ausnahme von $\alpha_6\beta_4$ (Bindung an Intermediärfilamente), binden im Zellinneren an Aktinfilamente (70). Viele Integrine liegen nicht dauerhaft in einem aktiven Zustand an der Zelloberfläche vor. In ihrem inaktiven Zustand binden sie weder Liganden noch sind sie in „*Signalling*-Prozesse“ der Zelle involviert (70). So führen spezifische Stimuli zu einer regulierten Aktivierung, sodass beispielsweise darauf erst die Bindung an spezifische Liganden einsetzt (70).

1.8.2 Signalübertragung durch Integrine

Integrine sind zu einer bidirektionalen Signalübertragung befähigt (71). Das ermöglicht intrazelluläre und extrazelluläre Prozesse miteinander zu vereinigen. Man unterscheidet zwischen dem „*Outside-in Signalling*“ und dem „*Inside-out Signalling*“.

Beim „*Outside-in Signalling*“ führt die Ligandenbindung an der extrazellulären Domäne zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege (71).

Beim „*Inside-out Signalling*“ hingegen binden intrazelluläre Effektoren an die zytoplasmatische Domäne der Integrine und induzieren damit eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne. Dies führt zu einer Affinitätssteigerung für die Bindung von Liganden an der extrazellulären Domäne (72).

Es sind Multiproteinkomplexe, die den Kontakt zwischen Integrin-Rezeptoren, intrazellulären Proteinen und Aktinfilamenten herstellen. Diese bezeichnet man als „*Focal Adhesion Points*“ (73).

Integrine und ihre Liganden sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Sie nehmen Schlüsselrollen im Rahmen der Embryogenese, der Immunreaktion, der Migration von Leukozyten oder der Regulation der Hämostase ein (70). Darüber hinaus sind sie an der Entstehung von Tumorerkrankungen und vielen anderen Krankheiten des Menschen

beteiligt (70). Als zelluläre Signaltransduktoren beeinflussen die Integrine die Zellhomöostase und regulieren sowohl Proliferation und Apoptose als auch Genexpression und die Zelldifferenzierung (70).

Integrine sind in ihrer Funktion als Zelladhäsionsmoleküle der extrazellulären Matrix an Prozessen der Mechanotransduktion und dem Wachstumsfaktor-*Signalling* beteiligt (70, 74).

In der Leber dominieren drei Isoformen der Integrine, $\alpha_1\beta_1$ -, $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_9\beta_1$ -Integrine (75).

1.8.3 $\alpha_5\beta_1$ -Integrine

Das $\alpha_5\beta_1$ -Integrine die dominierende Isoform der Integrine in der Leber (9). Der natürliche Ligand des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins ist das Glykoprotein Fibronectin. Die Peptidsequenz, die die α -Untereinheit des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins dabei erkennt, besteht aus den drei Aminosäuren Arginin (Arg), Glycin (Gly) und Aspartat (Asp). Die Peptidsequenz Arg-Gly-Asp bezeichnet man als „*RGD*-Motiv“ (76).

Die Interaktion zwischen dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und Fibronectin beeinflusst die Konformation der extrazellulären Matrix und reguliert die Zelladhäsion und Zellmigration (77).

In perfundierten Rattenlebern führt die Stimulation des Lebergewebes mit der hydrophilen Gallensäure Tauroursodeoxycholsäure (TUDC) zu einer Aktivierung der β_1 -Integrine. Die aktive Konformation der β_1 -Integrine ist dabei überwiegend intrahepatisch nachweisbar (10).

Andere Gallensäuren, wie Glykochenodeoxycholsäure (GCDC) oder aber Taurochenodeoxycholsäure (TCDC), haben keinen Effekt auf die Aktivität der β_1 -Integrine (10). Keine der Gallensäuren hat einen Einfluss auf die Gesamtexpression des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins (10). Die Aktivierung der β_1 -Integrine durch TUDC wurde auch in humanen Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen nachgewiesen (10).

In ihrer Funktion als Osmosensoren der Hepatozyten werden die β_1 -Integrine durch eine hypoosmolare Umgebung und der damit verbundenen Volumenzunahme der Hepatozyten aktiviert (69).

Im Gegensatz zu der Aktivierung der β_1 -Integrine durch TUDC werden sie in ihrer Rolle als Osmosensoren jedoch nicht intrahepatisch, sondern in der Plasmamembran der Hepatozyten aktiviert (10, 78).

Die Volumenzunahme der Hepatozyten durch Insulin hat ebenfalls eine Aktivierung der β_1 -Integrine in der Plasmamembran der Leberzelle zur Folge (78).

Voraussetzung für die intrahepatische Aktivierung der β_1 -Integrine durch TUDC ist die Aufnahme dieser Gallensäure (10). TUDC gelangt über den Natrium-Taurocholat-Cotransporter (Ntcp) in die Hepatozyten.

In *in silico*-Analysen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gohlke die Interaktion zwischen TUDC und dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin untersucht. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass TUDC mit der Kopffregion des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins interagiert (10). Diese Interaktion hat einen allosterischen Effekt auf die Konformation der β -Untereinheit (UE) des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins, wodurch das Integrin aktiviert wird (10). Im Fokus der Konformationsänderung stehen die zentrale Region der α_1 -Helix und das N-terminale Ende der α_7 -Helix der β -UE (10). Durch die Bindung von TUDC verringert sich der Abstand zwischen dem Leu165 der α_1 -Helix und dem Ile371 der α_7 -Helix. Zudem verstärkt sich das Abknicken der α_1 -UE durch die Bindung von TUDC um den Faktor 10^6 (10).

1.9 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss die Gallensäuren Glykochenodeoxycholsäure und Tauroursodeoxycholsäure auf die Lokalisation des Gallensalztransporters Natrium-Taurocholat-Cotransporter an der basolateralen Membran und die Lokalisation des Gallensalztransporters *Bile salt export pump* an der kanalikulären Membran in perfundierten Rattenlebern haben.

Diesbezüglich wurde unter dem Einsatz von Inhibitoren außerdem untersucht, ob die choleretische Wirkung der Tauroursodeoxycholsäure durch β_1 -Integrine und die Proteinkinase A vermittelt wird.

Zudem wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Auswirkung die Stimulation mit hyperosmolarem Medium (385 mosmol/l) und Tauroursodeoxycholsäure auf die Lokalisation des Gallensalztransporters Natrium-Taurocholat-Cotransporter an der basolateralen Membran in perfundierten Rattenlebern hat.

Dabei wurde unter dem Einsatz eines Inhibitors weiter untersucht, ob die choleretische Wirkung der Tauroursodeoxycholsäure von dem Aktivitätsniveau der β_1 -Integrine abhängig ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Firma
LSM 510 Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
LSM 880 Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kryostat	Leica, Wetzlar, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Kanüle (Ø 0,9 x 40 mm)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Spritze (20ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon-Tubes	BD Falcon, Durham, USA
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pipetten (variable Volumina)	Eppendorf, Hamburg
Stripetten (variable Volumina)	Corning Incorporated, NY, USA

2.1.3 Reagentien

Reagentien	Firma
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fluoromount G-Mounting Medium	Tocris/Biozol, Eching, Deutschland
Glykochenodeoxycholsäure (GCDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<u>GRADSP</u>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<u>GRGDSP</u>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
H89	Tocris/Biozol, Eching, Deutschland
Immersionsöl Immersol™ 518F	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
PBS (1X)	gibco life technologies, Paisley, Schottland
PBS (1X)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tauroursodeoxycholsäure (TUDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Firma
Anti Kaninchen Bsep	Geschenk von Prof. Dr. Stieger (Kantonsspital, Zürich, Schweiz)
Anti Kaninchen Cy3	Millipore, Darmstadt, Deutschland, Katalognummer: AP132C
Anti Kaninchen IgG	Dako, Hamburg, Deutschland Katalognummer: F0200
Anti Kaninchen Ntcp	Geschenk von Prof. Dr. Stieger (Kantonsspital, Zürich, Schweiz)
Anti Maus FITC	Millipore, Darmstadt, Deutschland Katalognummer: AP130F
Anti Maus IgG	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland Katalognummer: 1706516

Anti Maus Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Millipore, Darmstadt, Deutschland Katalognummer: 05-369
Anti Maus ZO1	Invitrogen, Carlsbad, USA Katalognummer: 33-9100

2.2 Methoden

2.2.1 Leberperfusionen

In den durchgeführten Untersuchungen wurden Lebern von männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 140-160g verwendet. Diese wurden in einem offenen System ohne Rezirkulation des Perfusates perfundiert, wie es in folgender Publikation von Herrn Prof. Dr. Sies beschrieben ist (79). Als Perfusionsmedium wurde mit Bikarbonat gepufferte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, die L-Lactat (2.1 mmol/l) und Pyruvat (0.3 mmol/l) enthielt. Der Gasgehalt betrug 5% für CO₂ und 95% für O₂ bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 7,4. Die Osmolarität bei den normoosmotischen Perfusionen wurde auf 305 mosmol/l festgelegt. Bei den hyperosmolaren Perfusionen wurde eine Osmolarität von 385 mosmol/l eingestellt, wofür die Konzentration von NaCl im Perfusionsmedium angehoben wurde. Die Flussrate des Perfusates durch die Leber betrug 3.5-4 ml/g Leber/min. Zur Abschätzung des Gewichts der Leber wurde diese mit 4% des Gesamtgewichtes der Ratte berechnet. Die Zusätze, wie das Integrin-hemmende Peptid *GRGDSP* (10 µmol/l), das Kontrollpeptid *GRADSP* (10 µmol/l), H89 (2 µmol/l) oder aber die Gallensalze GCDC (20 µmol/l) und TUDC (20 µmol/l), wurden vor der Leberpassage der Krebs-Henseleit-Lösung zugefügt. Die Zellviabilität der perfundierten Lebern wurde durch die kontinuierliche Messung des Gehalts an Lactatdehydrogenase im Effluat kontrolliert. Portaler Druck, die effluente K⁺-Konzentration und der pH-Wert wurden ebenfalls zur Kontrolle kontinuierlich bestimmt.

Die Perfusionen wurden von Frau Nicole Eichhorst durchgeführt. Die Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung der zur Perfusion verwendeten Ratten lauten G214/12 und G287/15.

2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Färbungen wurden 7 µm dicke Gefrierdünnschnitte aus den perfundierten Rattenlebern angefertigt und auf Objektträger übertragen. Diese wurden zunächst in

Methanol für 2 min bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Dann wurden die Schnitte 3-mal für jeweils 5 min in PBS (1x) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Blockierung für 30 min in 5%igem FCS bei Raumtemperatur. Darauf wurden die Leberschnitte mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Folgende Konzentrationen wurden dabei zur Färbung verwendet: Ntcp (1:200), Na^+/K^+ -ATPase (1:200), Bsep (1:200) und ZO-1 (1:500). Die Antikörper wurden in PBS gelöst, dem 1% FCS zugesetzt wurde. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Leberschnitte wiederum 3-mal für jeweils 5 min in PBS (1x) gewaschen. Es folgte die Färbung mit den sekundären fluoreszierenden Antikörpern *anti-mouse-FITC* und *anti-rabbit-Cy3* in einer Konzentration von 1:500 in PBS gelöst. Die Einwirkzeit der sekundären Antikörper betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die gefärbten Schnitte wurden abschließend mit Fluoromount-G-Reagenz eingedeckt und mit einem Deckgläschen bedeckt.

2.2.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Bei einem Konfokalmikroskop handelt es sich um ein spezielles Lichtmikroskop. Im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie wird nicht das ganze Präparat beleuchtet, sondern nur ein eingegrenzter Bereich davon. Zudem befindet sich im Strahlengang eine Lochblende, die dafür sorgt, dass nur Licht aus der fokalen Ebene zu dem Detektor gelangt. Daraus resultieren optische Schnittbilder mit hohem Kontrast. In der vorliegenden Arbeit wurden das konfokale Laser Scanning Mikroskop LSM510meta und das Laser Scanning Mikroskop LSM880 von Carl Zeiss verwendet. Die beiden unterschiedlichen Mikroskope wurden in voneinander unabhängigen Experimentserien verwendet. Zu der Anfertigung der mikroskopischen Aufnahmen wurden zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen verwendet. Es wurde die Wellenlänge 488 nm eines Argon-Lasers und ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm verwendet.

2.2.4 Densitometrische Analyse und Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die densitometrische Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen orientierte sich an der Integrität und Vergleichbarkeit der Fluoreszenzprofile der Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Membran und des *Tight junction*-Proteins ZO-1 an der kanalikulären Membran.

Die ausgewählten Fluoreszenzprofile der Na^+/K^+ -ATPase weisen das Maximum ihrer Fluoreszenzintensität in der Membranmitte der basolateralen Membran auf mit einer

geringen Fluoreszenzintensität an den Seitenrändern beidseits der Membranmitte (siehe Abb. 4). An der basolateralen Membran wurden der Gallensalztransporter Natrium-Taurocholat-Cotransporter (Ntcp) sowie die Na^+/K^+ -ATPase angefärbt.

Die ausgewählten Fluoreszenzprofile von ZO-1, einem *Tight junction*-Protein, das die Grenze zwischen basolateraler und kanalikulärer Membran zieht, zeigen einen zweigipfligen Verlauf ihres Fluoreszenzprofiles. Die Auswahlkriterien hierbei waren ein paralleler Verlauf der Kurvenverläufe zu beiden Seiten sowie eine etwa gleiche Höhe der beiden Maxima (siehe Abb. 5) In Abb. 6 ist schematisch gezeigt, wie zwei benachbarte Hepatozyten einen Gallekanalikulus ausbilden.

An der kanalikulären Membran wurden der Gallensalztransporter *Bile salt export pump* (Bsep) sowie ZO-1 angefärbt.

Zu der Analyse der mikroskopischen Bilder wurde die Software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville) verwendet. Der Analysebalken wurde senkrecht an der zu untersuchenden Membran angelegt. Ausgegeben wurde das Fluoreszenzprofil über eine Länge von 8 μm . Der Analysebalken wurde hierbei so positioniert, dass jeweils 4 μm von der Membranmitte ausgehend in die Peripherie auf beiden Seiten gemessen und analysiert wurden. Die Software gibt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität je Pixel an.

Die so erhaltenen Werte wurden in ein Excel-Dokument übertragen. Hier wurde jeder Wert mathematisch auf den Mittelwert aller gemessenen Fluoreszenzintensitäten eines jeden Pixels normalisiert und die Standardabweichung ermittelt.

Aus diesen Werten wiederum resultieren die im Ergebnisteil aufgeführten Kurvenverläufe von Ntcp, Bsep, Na^+/K^+ -ATPase sowie ZO-1 (siehe Abb. 4 und Abb. 5).

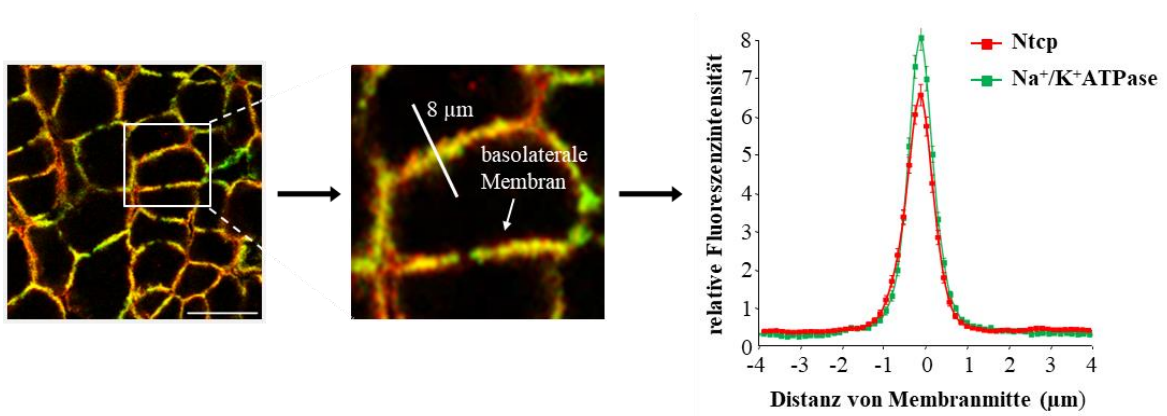


Abb. 4: Densitometrische Analyse und Quantifizierung der Immunfluoreszenz von Ntcp und der Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Membran.

Gefrierdünnschnitte perfundierter Rattenlebern wurden für Ntcp (rot) und die Na^+/K^+ -ATPase (grün) immunfluoreszenzgefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscanningmikroskop generiert. Die Immunfluoreszenzbilder wurden anschließend einer densitometrischen Analyse unterzogen. Der insgesamt $8\ \mu\text{m}$ ausmessende Analysebalken wurde dabei senkrecht an der basolateralen Membran zweier benachbarter Hepatozyten platziert. Der Analysebalken wurde dabei so platziert, dass die maximale Fluoreszenzintensität der Na^+/K^+ -ATPase auf Höhe der Membranmitte liegt. Die Kurvenverläufe von Ntcp und der Na^+/K^+ -ATPase ergeben sich aus den mathematisch auf den Mittelwert aller gemessenen Fluoreszenzintensitäten eines jeden Pixels normalisierten Fluoreszenzwerten. (entnommen und modifiziert aus Sommerfeld *et al.*, 2015)

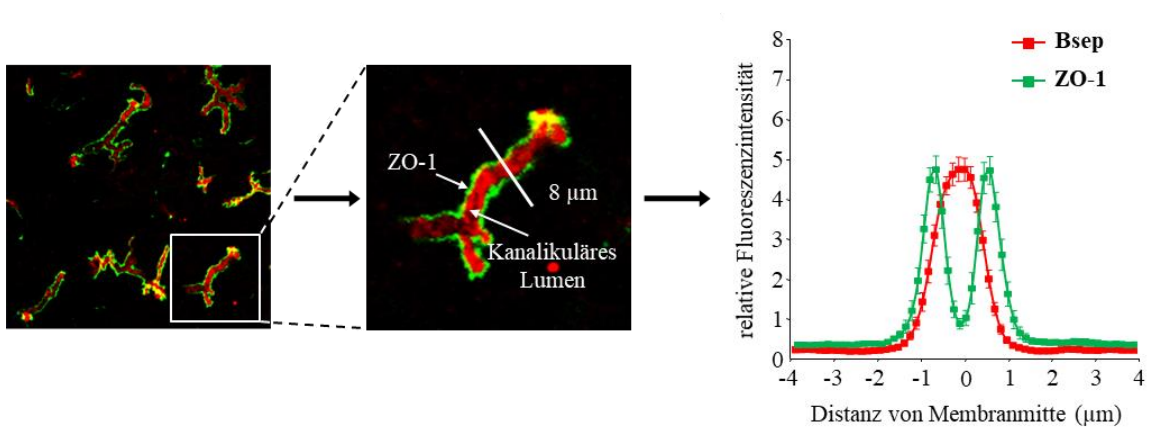


Abb. 5: Densitometrische Analyse und Quantifizierung der Immunfluoreszenz von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran.

Gefrierdünnschnitte perfundierter Rattenlebern wurden für Bsep (rot) und ZO-1 (grün) immunfluoreszenzgefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscanningmikroskop generiert. Die Immunfluoreszenzbilder wurden anschließend einer densitometrischen Analyse unterzogen. Der insgesamt $8\ \mu\text{m}$ ausmessende Analysebalken wurde dabei senkrecht an der kanalikulären Membran platziert. Die Mitte des kanalikulären Lumens korreliert hierbei mit der minimalen Fluoreszenzintensität im Kurvenverlauf von ZO-1. Die Kurvenverläufe ergeben sich aus den mathematisch auf den Mittelwert aller gemessenen Fluoreszenzintensitäten eines jeden Pixels normalisierten Fluoreszenzwerten. (entnommen und modifiziert aus Sommerfeld *et al.*, 2015)

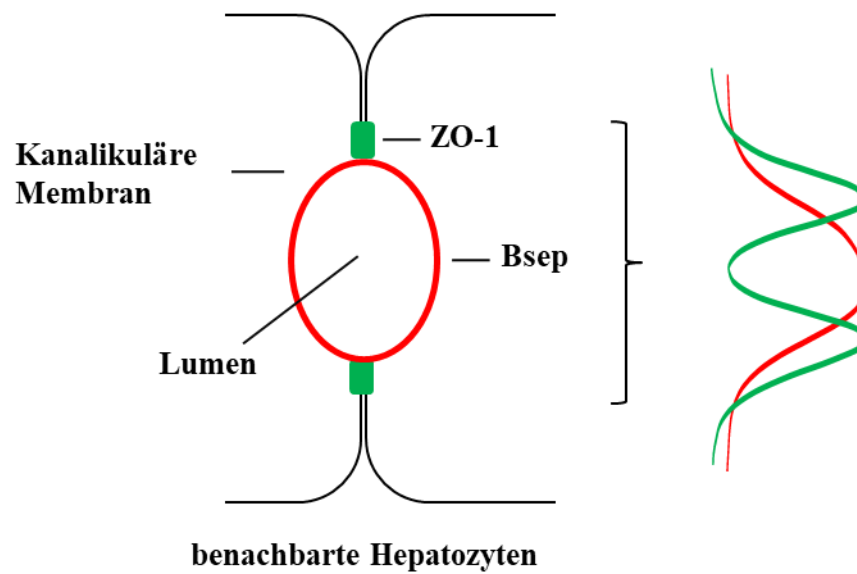


Abb. 6: Graphische Veranschaulichung der Entstehung und des Verlaufes der Fluoreszenzprofile von Bsep und ZO-1.

Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, bildet das *tight-junction*-Protein ZO-1 die Grenze zwischen der basolateralen Membran und der kanalikulären Membran benachbarter Hepatozyten. Durch die Verbindung der apikalen Pole zweier Hepatozyten bildet sich das Lumen der Gallekanalikululi aus. (entnommen und modifiziert aus Sommerfeld *et al.*, 2015)

2.2.5 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit verarbeiteten Zahlenwerte stellen die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dar. Zu der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der t-Test oder aber die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet.

Die t-Testung wurde zu der Überprüfung des Signifikanzniveaus der Fluoreszenzmaxima im Kurvenverlauf des Fluoreszenzprofils der Gallensalztransporter und Kontrollproteine zwischen den jeweils miteinander verglichenen Stimulationen angewendet.

Die einfaktorielle Varianzanalyse wurde hingegen im Rahmen der Überprüfung des Signifikanzniveaus der kanalikulären Verbreiterung eingesetzt.

$p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Pro Versuchsbedingung wurden drei voneinander unabhängige und individuelle Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurden 10-30 unterschiedliche Bildabschnitte in die Auswertung einbezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Regulation der Plasmamembranlokalisation des Gallensalztransporters Ntcp durch GCDC und TUDC

3.1.1 GCDC führt zu einem Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran in perfundierten Rattenlebern

Die Lokalisation des Gallensalztransporters Ntcp an der basolateralen Membran zum Zeitpunkt 90 min wurde zwischen den Kontrolltieren (305 mosmol/l) und den Tieren verglichen, die über 90 min mit der hydrophoben Gallensäure GCDC (20 $\mu\text{mol/l}$) perfundiert wurden.

Hierzu wurden mikroskopische Aufnahmen an einem Konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt (siehe Abb. 7).

Die mikroskopischen Bilder wurden, wie im Methodenteil beschrieben, einer densitometrischen Analyse unterzogen. Hieraus ergeben sich die Fluoreszenzprofile, wie sie in Abb. 8 zu sehen sind.

Durch die Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure GCDC ändert sich das Fluoreszenzprofil von Ntcp zum Zeitpunkt 90 min insofern, dass die Fluoreszenzintensität in der Membranmitte signifikant abnimmt. Zudem nimmt die Fluoreszenzintensität beidseits der Membranmitte in den lateral gelegenen Bereichen zu (Abb. 8).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Gallensäure GCDC zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran führt. Die Gelbfärbung der basolateralen Membran als Mischfarbe aus rot fluoreszierendem Ntcp und grün fluoreszierender Na^+/K^+ -ATPase nimmt ab und in dem Bereich beidseits der Membranmitte nimmt die Rotfärbung zu (siehe Abb. 7).

Demgegenüber hat die Stimulation mit GCDC keinen Effekt auf die Fluoreszenzverteilung der Na^+/K^+ -ATPase (siehe Abb. 8).

Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die GCDC-vermittelte Internalisierung von Ntcp bereits nach 60-minütiger Stimulation einsetzt (siehe Abb. 9).

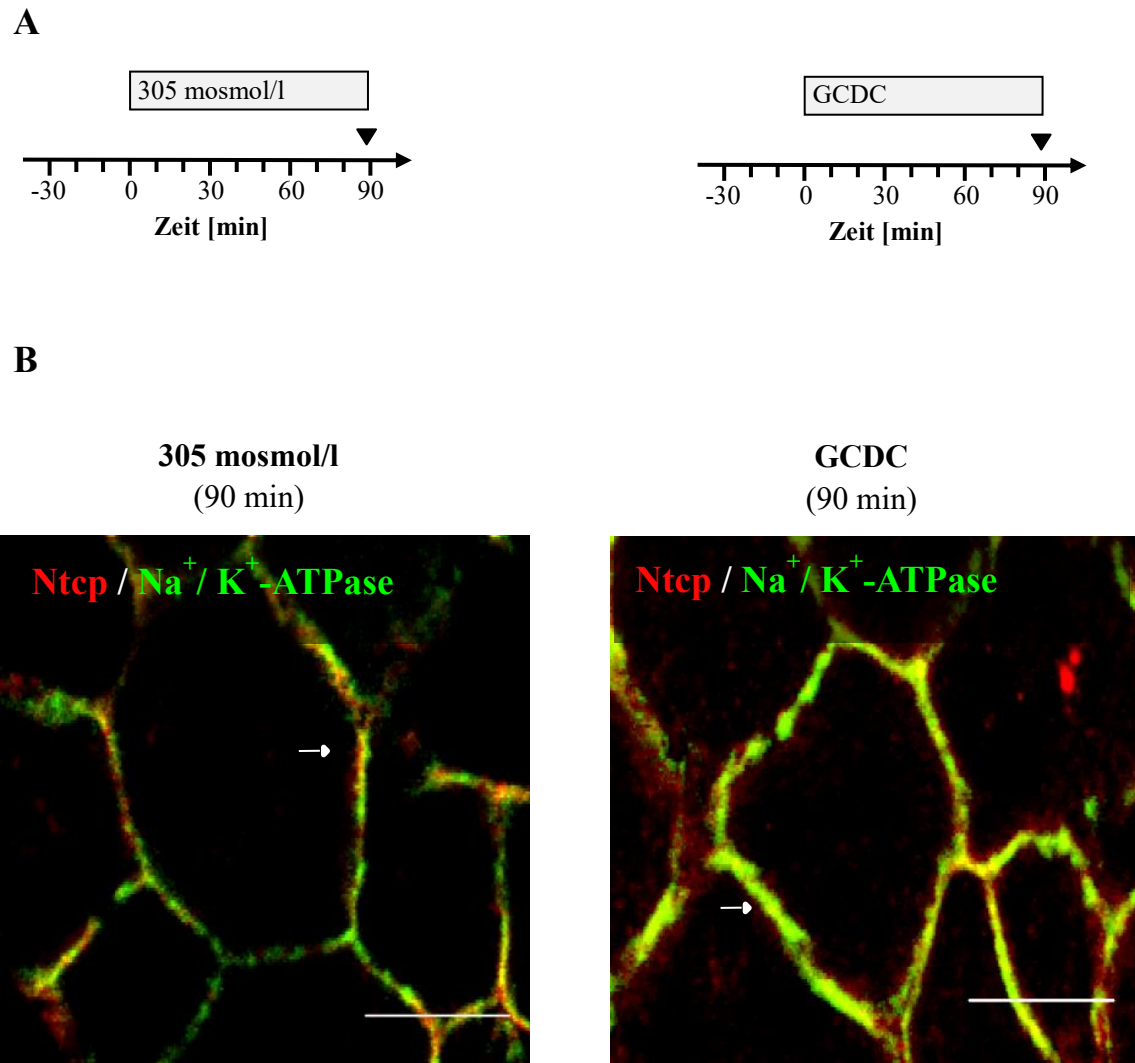


Abb. 7: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na^+/K^+ -ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach der Perfusion mit GCDC-freiem oder GCDC-haltigem normoosmotischen Medium.

Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne (A) wurden Rattenlebern mit normoosmotischem Medium (305 mosmol/l) mit und ohne GCDC (20 $\mu\text{mol/l}$) über einen Zeitraum von 90 min perfundiert. Den Ratten wurde zu dem Zeitpunkt 90 min ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Ntcp in Rot und der Na^+/K^+ -ATPase zur Kontrolle in Grün. Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an (B). Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μm .

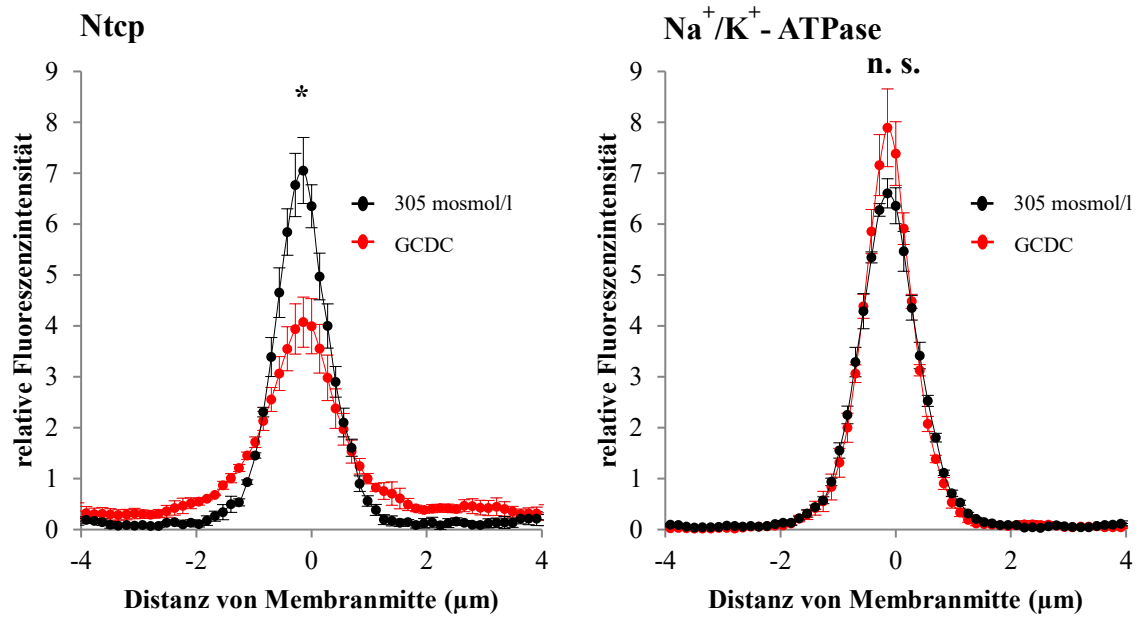


Abb. 8: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase nach der Perfusion mit GCDC-freiem oder GCDC-haltigem normoosmotischen Medium zum Zeitpunkt 90 min.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen ein. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). n. s.: nicht signifikant (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

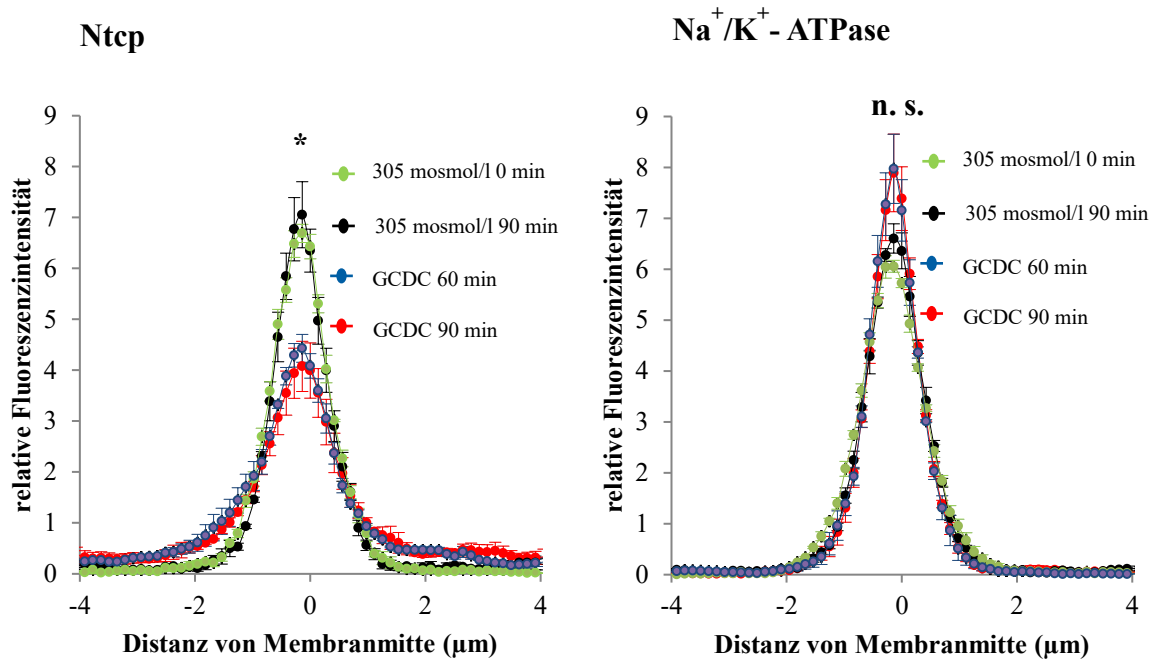


Abb. 9: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase nach der Perfusion mit GCDC-freiem normoosmotischen Medium zu den Zeitpunkten 0 min und 90 min und mit GCDC-haltigem normoosmotischen Medium zu den Zeitpunkten 60 min und 90 min.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen ein. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). n. s.: nicht signifikant (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.1.2 TUDC führt zu einem Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran nach GCDC-induziertem Ausbau

Welchen Effekt TUDC an der basolateralen Membran auf die Lokalisation von Ntcp hat, wird in dem im Folgenden beschriebenen Experiment dargelegt.

Dafür wurden die Rattenlebern für 90 min mit der hydrophoben Gallensäure GCDC perfundiert. Wie in 3.1.1 bereits beschrieben, führt die Stimulation mit GCDC bereits nach 60 min zu einem Ausbau von Ntcp. Zu dem Zeitpunkt 90 min liegt der Ausbau des Transporters weiterhin vor.

Dem Perfusat wurde ab dem Zeitpunkt 60 min zudem die hydrophile Gallensäure TUDC (20 $\mu\text{mol/l}$) zugefügt oder aber keine Änderung vorgenommen.

Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder zu den jeweiligen Stimulationen zu dem Zeitpunkt 90 min zeigt die Abb. 10.

Vergleicht man die Fluoreszenzprofile der beiden Stimulationen (GCDC vs. GCDC + TUDC) zu dem Zeitpunkt 90 min miteinander, so zeigt das Fluoreszenzprofil von Ntcp unter Zugabe von TUDC eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität in der Membranmitte ($p < 0.05$).

Zudem stellt sich im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit GCDC ein schmalerer Kurvenverlauf dar und die Fluoreszenzintensität um die Membranmitte nimmt ab (siehe Abb. 11).

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Gallensäure TUDC innerhalb von 30 min zu einem Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran führt, nachdem es vorher zu einem GCDC-induzierten Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp gekommen ist.

Demgegenüber bleibt die Fluoreszenzverteilung der Na^+/K^+ -ATPase unbeeinflusst von der Stimulation.

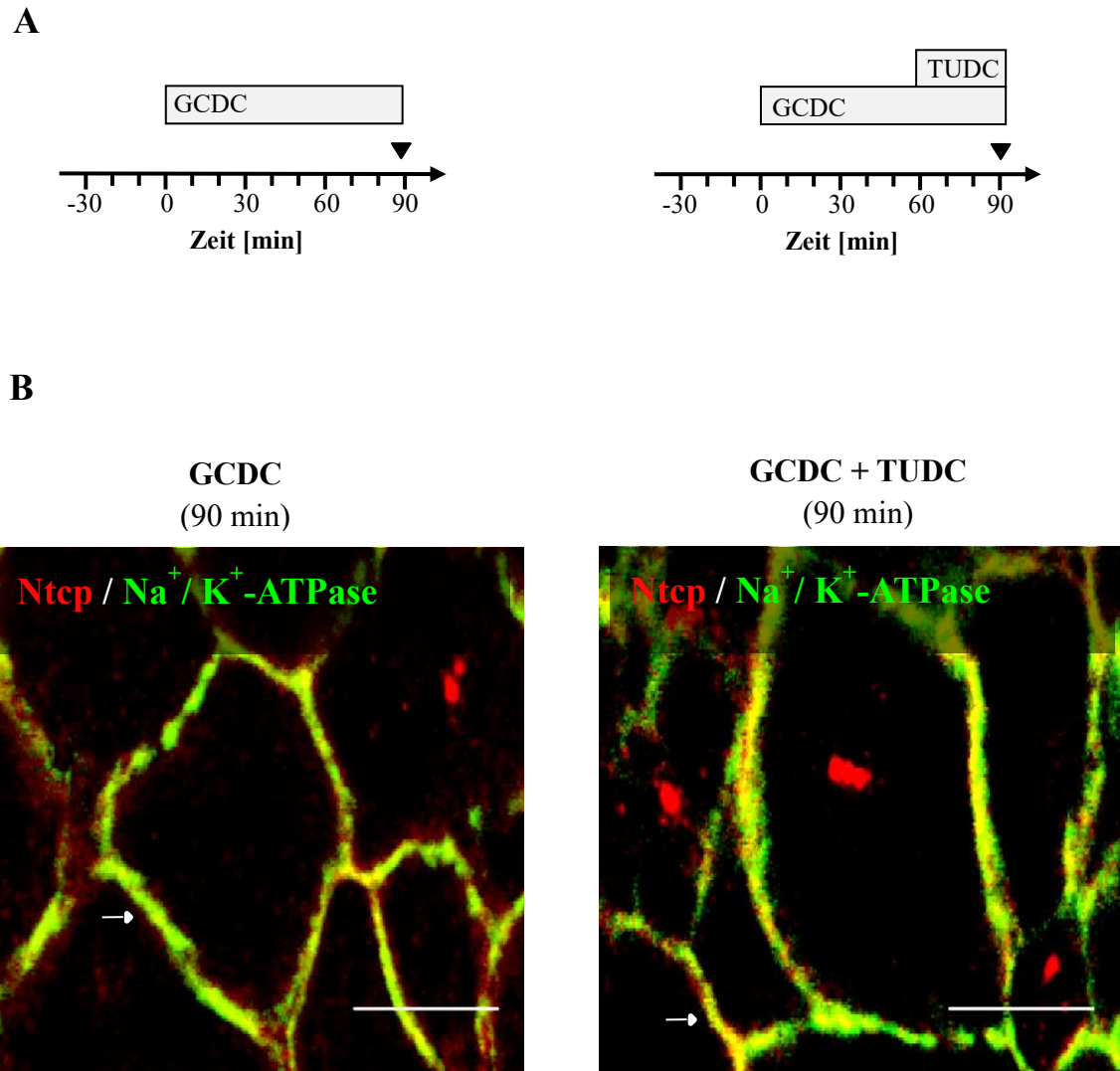


Abb. 10: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na^+/K^+ -ATPase (grün) nach der Perfusion mit GCDC und der Perfusion mit GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min. Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne (A) wurden Rattenlebern mit normoosmotischem Medium (305 mosmol/l) unter Zusatz von GCDC oder aber GCDC und TUDC (je 20 $\mu\text{mol/l}$) perfundiert. Den Ratten wurde zu dem Zeitpunkt 90 min ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Ntcp in Rot und der Na^+/K^+ -ATPase zur Kontrolle in Grün (B). Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an. Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μm .

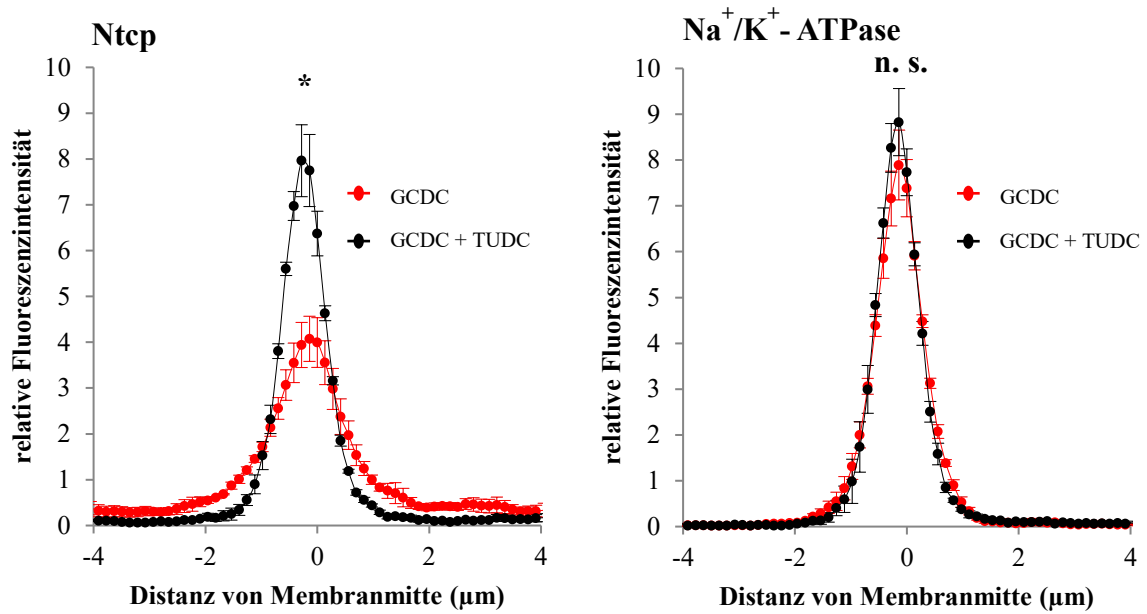


Abb. 11: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit GCDC und der Perfusion mit GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase über der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung (Stimulation mit/ohne TUDC) je 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). n. s.: nicht signifikant (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.1.3 Der TUDC-induzierte Wiedereinbau von Ntcp wird durch eine Aktivierung der β_1 -Integrine vermittelt

In diesem Experiment wurden die Rattenlebern entweder mit dem β_1 -Integrin-hemmenden Hexapeptid GRGDSP oder aber dem inaktiven Kontrollpeptid GRADSP perfundiert.

Beiden Versuchsanordnungen war gemeinsam, dass neben einer 90 min andauernden Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure GCDC ab dem Zeitpunkt 60 min die zusätzliche Stimulation mit der hydrophilen Gallensäure TUDC für 30 min erfolgte (siehe Abb. 12A).

Mit diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die β_1 -Integrine in den Prozess des TUDC-induzierten Wiedereinbaus des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran nach zuvor erfolgtem GCDC-induzierten Ausbau aus der basolateralen Membran involviert sind.

Das Fluoreszenzprofil von Ntcp weist bei der Stimulation mit GRGDSP + GCDC + TUDC eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität in der Membranmitte auf im Vergleich zu der Stimulation mit GRADSP + GCDC + TUDC.

Des Weiteren nimmt in der Stimulation mit GRGDSP + GCDC + TUDC die Fluoreszenzintensität von Ntcp beidseits der Membranmitte zu (siehe Abb. 13).

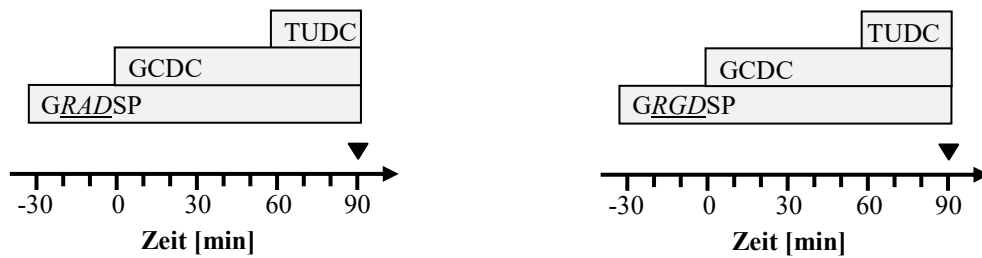
Dieses Ergebnis legt nahe, dass durch die Inaktivierung des β_1 -Integrins durch GRGDSP der GCDC-induzierte Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp trotz Zugabe der hydrophilen Gallensäure TUDC zu dem Zeitpunkt 90 min bestehen bleibt.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass für den TUDC-vermittelten Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp eine Aktivierung der β_1 -Integrine notwendig ist.

Demgegenüber bleibt die Fluoreszenzverteilung der Na^+/K^+ -ATPase über die Stimulationen hinweg unverändert.

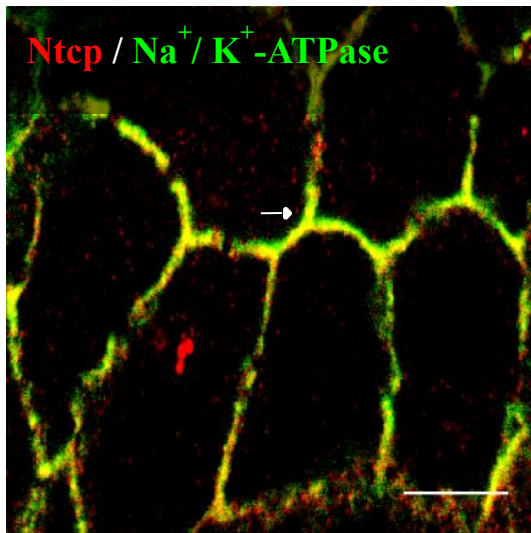
Zudem haben die Hexapeptide GRADSP und GRGDSP selbst keinen Einfluss auf die Lokalisation von Ntcp.

A



B

GRADSP + GCDC + TUDC
(90 min)



GRGDSP + GCDC + TUDC
(90 min)

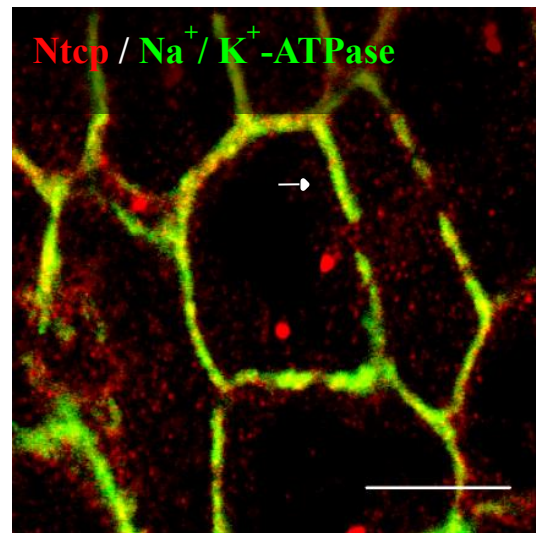


Abb. 12: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na^+/K^+ -ATPase (grün) nach der Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC sowie der Perfusion mit GRGDSP + GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.

Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit GRADSP + GCDC + TUDC oder aber GRGDSP + GCDC + TUDC perfundiert (A). Den Ratten wurden zu dem Zeitpunkt 90 min Leberstücke entnommen. Diese Leberstücke wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Ntcp in Rot und der Na^+/K^+ -ATPase zur Kontrolle in Grün (B). Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an. Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μm .

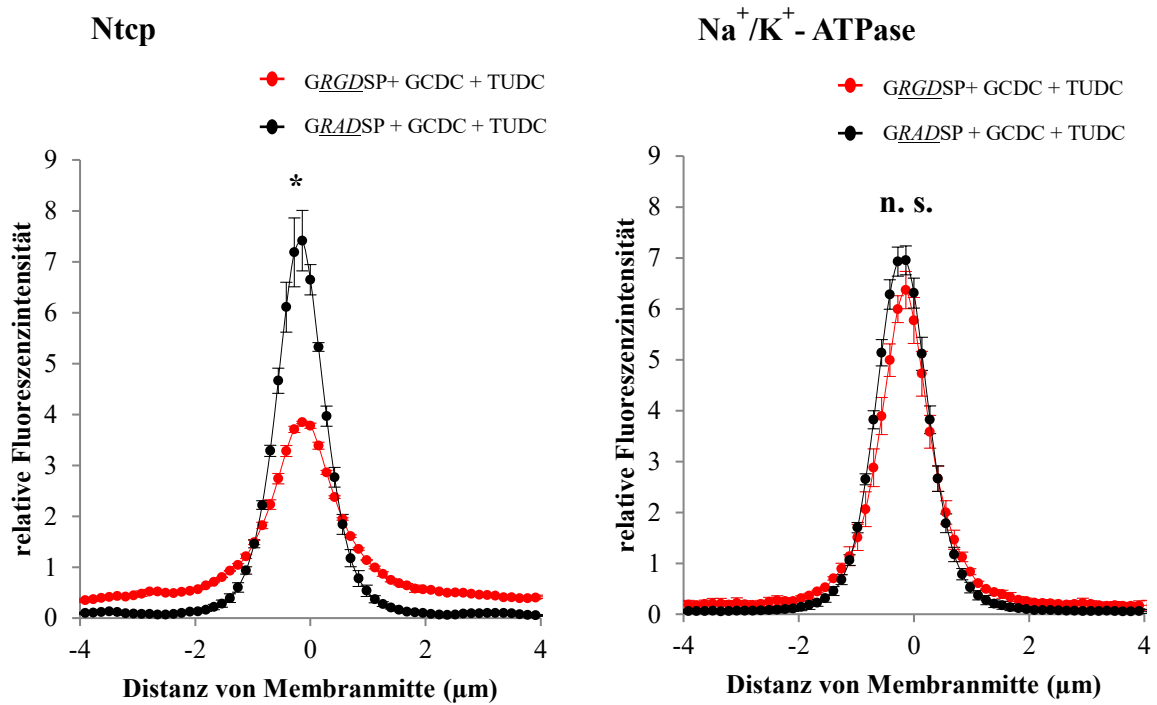


Abb. 13: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase nach der Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC sowie der Perfusion mit GRGDSP + GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung je 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen ein. Pro Leberpräparation wurden 30 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). n. s.: nicht signifikant (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.1.4 GRADSP und GRGDSP beeinflussen den GCDC-induzierten Ausbau von Ntcp nicht

In folgendem Experiment wurde untersucht, ob die Hexapeptide GRADSP und GRGDSP selbst den GCDC-induzierten Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran beeinflussen.

Hierzu wurden Rattenlebern wahlweise mit GRADSP oder GRGDSP über 120 min perfundiert. Zudem wurden Rattenlebern wahlweise mit GRADSP oder GRGDSP über 120 min und zusätzlich über 90 min mit GCDC perfundiert, wie in Abb. 14A dargestellt.

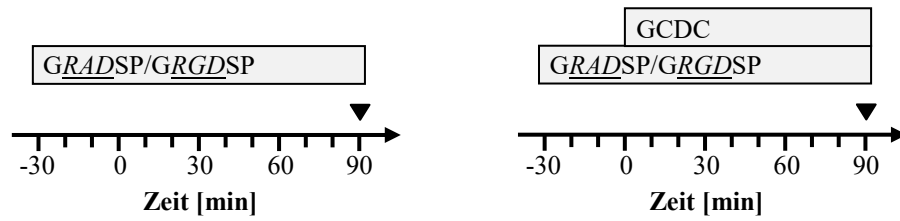
Der GCDC-induzierte Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran wird weder durch das Integrin-hemmende Hexapeptid GRGDSP noch durch das inaktive Kontrollpeptid GRADSP beeinflusst.

Wie in Abb. 14 B und Abb. 15 dargestellt, kommt es sowohl bei der Perfusion mit GRADSP + GCDC als auch bei der Perfusion mit GRGDSP + GCDC zu dem in dem Kapitel 3.1.1 beschriebenen GCDC-induzierten Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran.

Die alleinige Stimulation mit GRADSP oder GRGDSP beeinflusst die Lokalisation von Ntcp nicht (endogene Kontrolle mit dem Vergleich zum Zeitpunkt 0 min und 90 min).

Die Fluoreszenzverteilung der Na⁺/K⁺-ATPase bleibt über die Stimulationen hinweg unverändert.

A



B

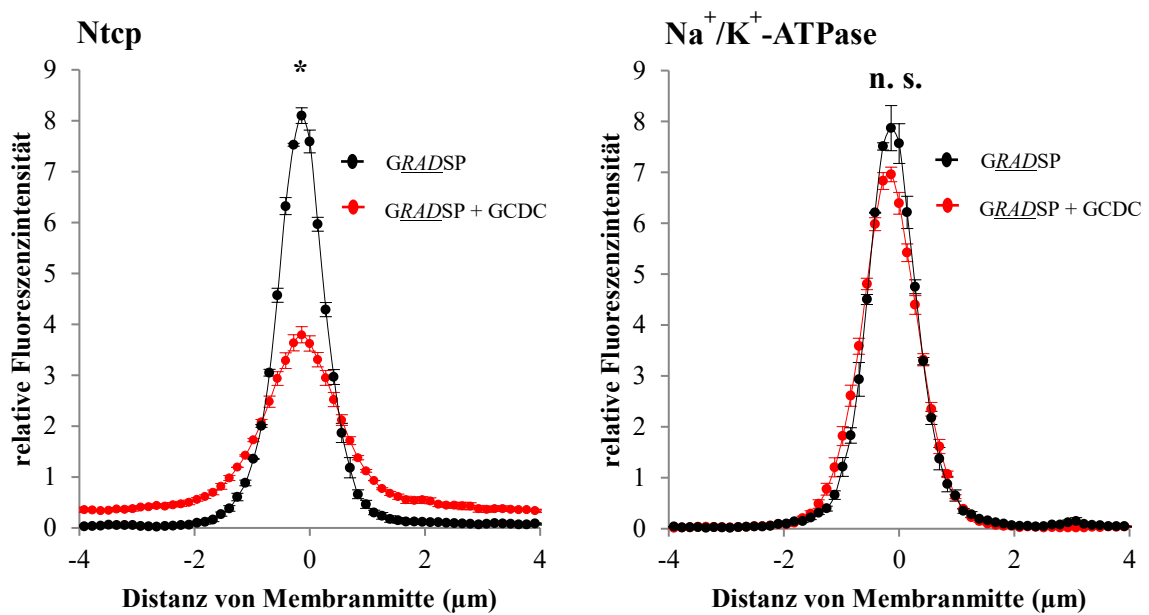


Abb. 14: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit *GRADSP* sowie der Perfusion mit *GRADSP* + GCDC zum Zeitpunkt 90 min.

Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit *GRADSP* oder aber *GRADSP* + GCDC perfundiert (A). Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung je 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). n. s.: nicht signifikant

(entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

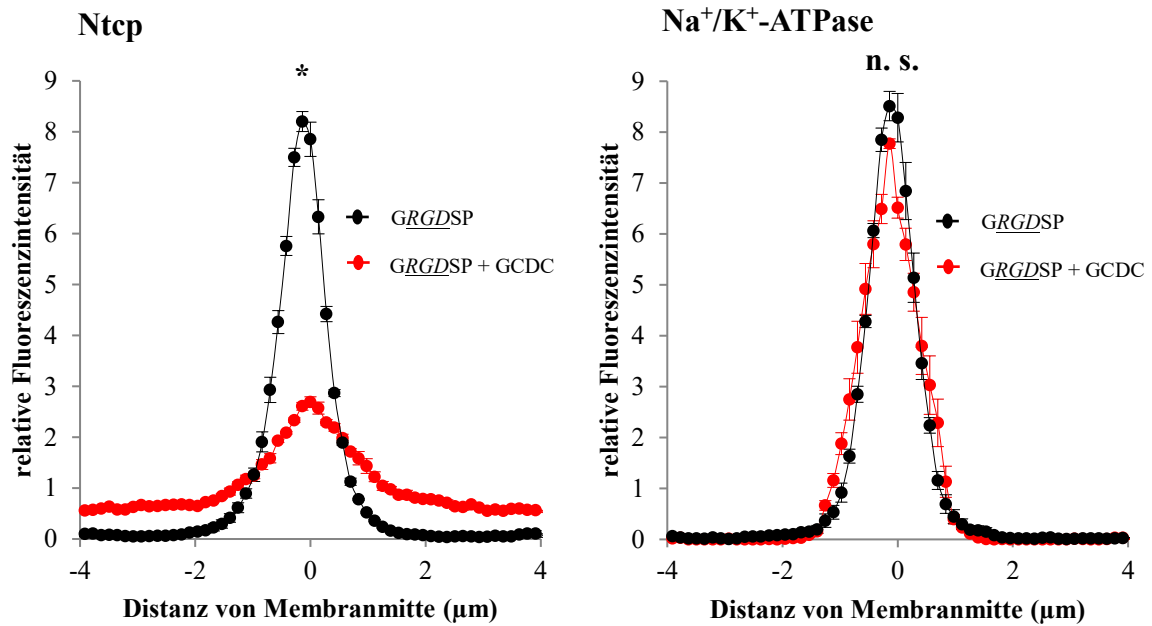


Abb. 15: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit GRGDSP sowie der Perfusion mit GRGDSP + GCDC zum Zeitpunkt 90 min.

Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit GRGDSP oder aber GRGDSP + GCDC perfundiert (A). Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung je 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). n. s.: nicht signifikant

(entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.1.5 H89 verhindert den TUDC-bedingten Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran

Es ist bekannt, dass TUDC die Proteinkinase A (PKA) über die β_1 -Integrine aktiviert (80). In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob die PKA für den TUDC-vermittelten Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran eine Rolle spielt. Hierfür wurden Versuche mit dem PKA-Inhibitor H89 durchgeführt.

Rattenlebern wurden mit H89 oder aber mit H89 + GCDC + TUDC perfundiert und die daraus resultierenden Fluoreszenzprofile zum Zeitpunkt 90 min miteinander verglichen.

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, zeigt das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp in der Stimulation mit H89 + GCDC + TUDC eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität in der Membranmitte im Vergleich zu der Fluoreszenzintensität von Ntcp in der Membranmitte in der Kontrollstimulation mit H89 zum Zeitpunkt 90 min. Zudem steigt die Fluoreszenzintensität in der Stimulation mit H89 + GCDC + TUDC um die Membranmitte in den lateral gelegenen Bereichen an (siehe Abb. 16).

Dies lässt einen Ausbau von Ntcp in der Stimulation mit H89 + GCDC + TUDC aus der basolateralen Membran vermuten. Trotz der Stimulation mit der hydrophilen, choleretisch wirksamen Gallensäure TUDC bleibt die Reinsertion von Ntcp in die basolaterale Membran aus. Daraus folgt, dass für die TUDC-abhängige Reinsertion von Ntcp in die basolaterale Membran nach GCDC-induziertem Ausbau aus der basolateralen Membran eine Aktivierung der PKA notwendig ist. Die alleinige Stimulation mit H89 hat keine Auswirkung auf die Lokalisation von Ntcp. Die Fluoreszenzverteilung der Na^+/K^+ -ATPase bleibt über die Stimulationen hinweg unverändert.

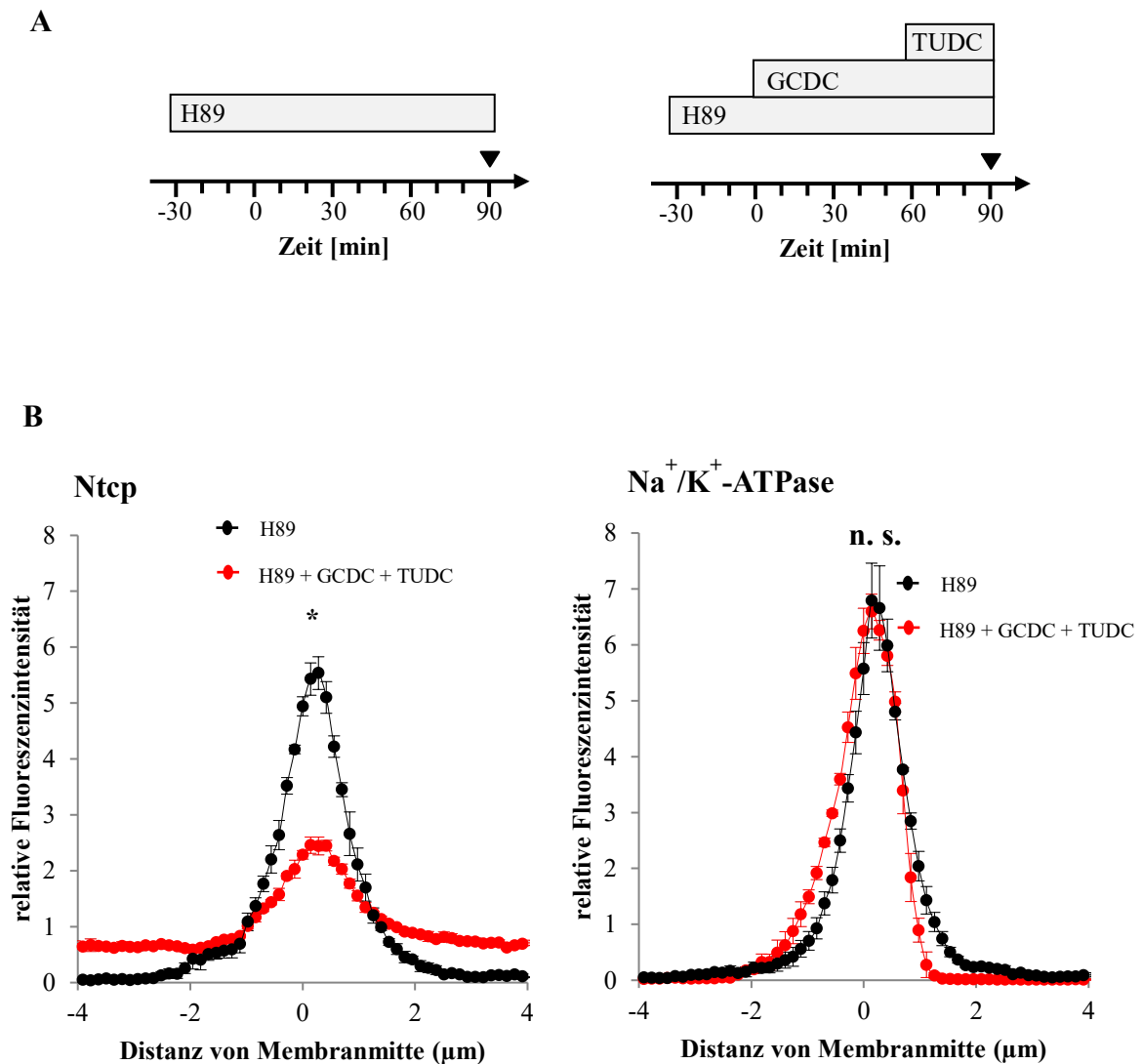


Abb. 16: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit H89 sowie der Perfusion mit H89 + GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.

Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit H89 oder aber H89 + GCDC + TUDC perfundiert (A). Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung je 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). n. s.: nicht signifikant

(entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.2 Die Regulation der Plasmamembranlokalisierung des Gallensalztransporters Bsep durch GCDC und TUDC

3.2.1 GCDC führt zu einer Verbreiterung des Gallekanalikus in perfundierten Rattenlebern

Nachdem in unseren Untersuchungen herausgefunden wurde, dass die hydrophobe Gallensäure GCDC innerhalb von 60 min zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp an der basolateralen Membran führt, sollte weitergehend überprüft werden, welchen Effekt die Gallensäure GCDC an der kanalikulären Membran auf die Lokalisation des dort gelegenen Gallensalztransporters Bsep und die Struktur des Gallekanalikus hat.

In dem im Folgenden beschriebenen Versuch wurde die Fluoreszenzverteilung des Gallensalztransporters Bsep an der kanalikulären Membran zu dem Zeitpunkt 90 min nach der Perfusion mit Kontrollmedium oder aber nach der Perfusion mit der hydrophoben Gallensäure GCDC (20 $\mu\text{mol/l}$) ermittelt und miteinander verglichen (siehe Abb. 18). Es wurde neben dem Gallensalztransporter Bsep das *tight junction*-Protein zonula occludens 1 (ZO-1) mit einem Antikörper angefärbt. Dieses begrenzt den Gallekanalikus.

Zunächst wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an einem konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt (siehe Abb. 17B).

Die erhaltenen Bilder wurden wie im Methodenteil beschrieben densitometrisch analysiert. Hieraus resultieren charakteristische Fluoreszenzprofile von Bsep und ZO-1, wie sie in Abb. 18 dargestellt sind.

Durch die Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure GCDC ändert sich das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Bsep zu dem Zeitpunkt 90 min insofern, dass die Fluoreszenzintensität von Bsep in der Kanalikusmitte signifikant abnimmt. (siehe Abb. 18).

Dies zeigt sich auch in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Das rot dargestellte Bsep zeigt nach Stimulation mit GCDC eine schwächere Fluoreszenz in den zentral gelegenen Bereichen der kanalikulären Membran und ist um die Kanalikusmitte herum breiter verteilt (siehe Abb. 17B).

Die Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure GCDC führt zudem zu einer signifikanten Verbreiterung des Gallekanalikus. Der räumliche Abstand zwischen den Immunreaktivitäten von ZO-1, die den Gallekanalikus begrenzen, vergrößert sich (siehe Abb. 18). Hierzu wurde der Abstand zwischen den Maxima von ZO-1 der jeweiligen

Perfusion auf beiden Seiten der kanalikulären Membran bestimmt und zwischen den Perfusionen verglichen.

Perimembranär zeigt sich im Zytosol der Hepatozyten keine Anfärbung für Bsep. Somit ist am ehesten davon auszugehen, dass die Verbreiterung des Fluoreszenzprofils von Bsep auf die Verbreiterung des Kanalikulärs zurückzuführen ist. Folglich kann nicht von einem Ausbau des Transporters aus der Membran gesprochen werden.

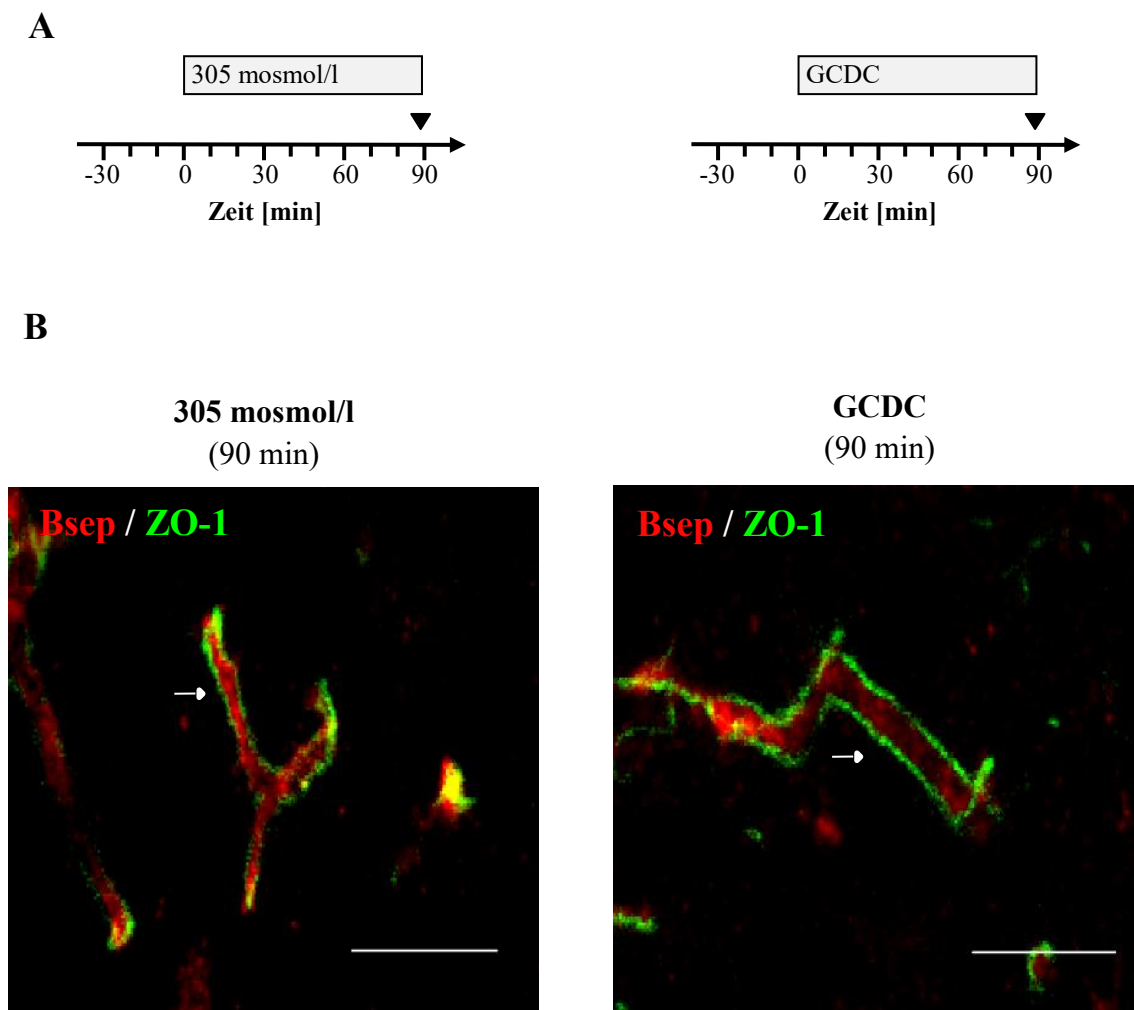


Abb. 17: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Bsep (rot) und ZO-1 (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit normoosmolarem Medium (305 mosmol/l) oder aber der Perfusion mit GCDC.

Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit normoosmolarem Medium (305 mosmol/l) oder aber der hydrophoben Gallensäure GCDC perfundiert (A). Den Ratten wurde zum Zeitpunkt 90 min ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Bsep in Rot und von ZO-1 zur Kontrolle in Grün (B). Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an. Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μm . (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

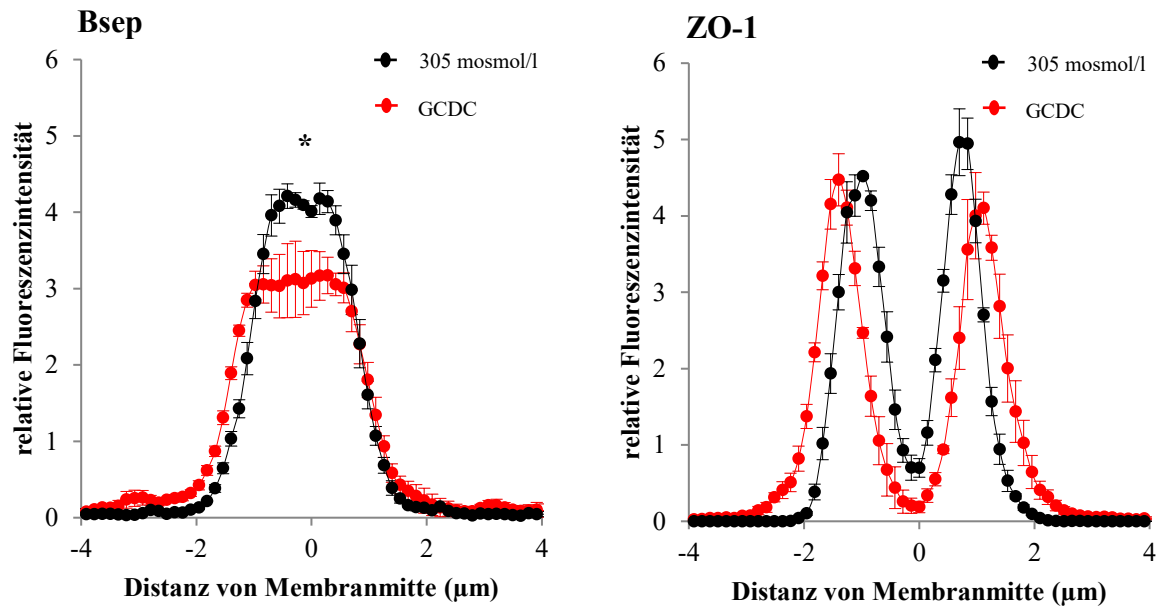


Abb. 18: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Stimulation mit normoosmolarem Medium (305 mosmol/l) oder aber der hydrophoben Gallensäure GCDC.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Bsep und von ZO-1 an der kanalikulären Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.2.2 Die Gallensäure TUDC hebt den GCDC-induzierten Effekt der kanalikulären Verbreiterung auf und führt zu einer Verschmälerung des Gallekanalikus

In diesem Experiment wurde zu dem Zeitpunkt 90 min die Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran nach Perfusion mit der hydrophoben Gallensäure GCDC (20 $\mu\text{mol/l}$) und der Perfusion mit GCDC unter Zugabe der hydrophilen Gallensäure TUDC (je 20 $\mu\text{mol/l}$) in perfundierten Rattenlebern miteinander verglichen. Die beiden voneinander separaten Perfusionsen erfolgten gemäß der Perfusionspläne, wie sie in Abb. 19A zu sehen sind.

Durch die Perfusion mit TUDC nimmt die Fluoreszenzintensität des Gallensalztransporters Bsep in der Stimulation mit GCDC + TUDC im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit GCDC in der Mitte des Kanalikus signifikant zu. Zudem weist das Fluoreszenzprofil von Bsep einen schmaleren Kurvenverlauf auf (siehe Abb. 20).

TUDC hat auch einen Effekt auf die durch GCDC induzierte Verbreiterung des Gallekanalikus. Dabei hemmt TUDC die durch GCDC induzierte Verbreiterung des Gallekanalikus.

Dadurch dass TUDC die GCDC-induzierte Verbreiterung des Gallekanalikus hemmt, stellt sich das Fluoreszenzprofil von Bsep schmäler dar mit einer höheren Fluoreszenzintensität von Bsep in der Kanalikusmitte.

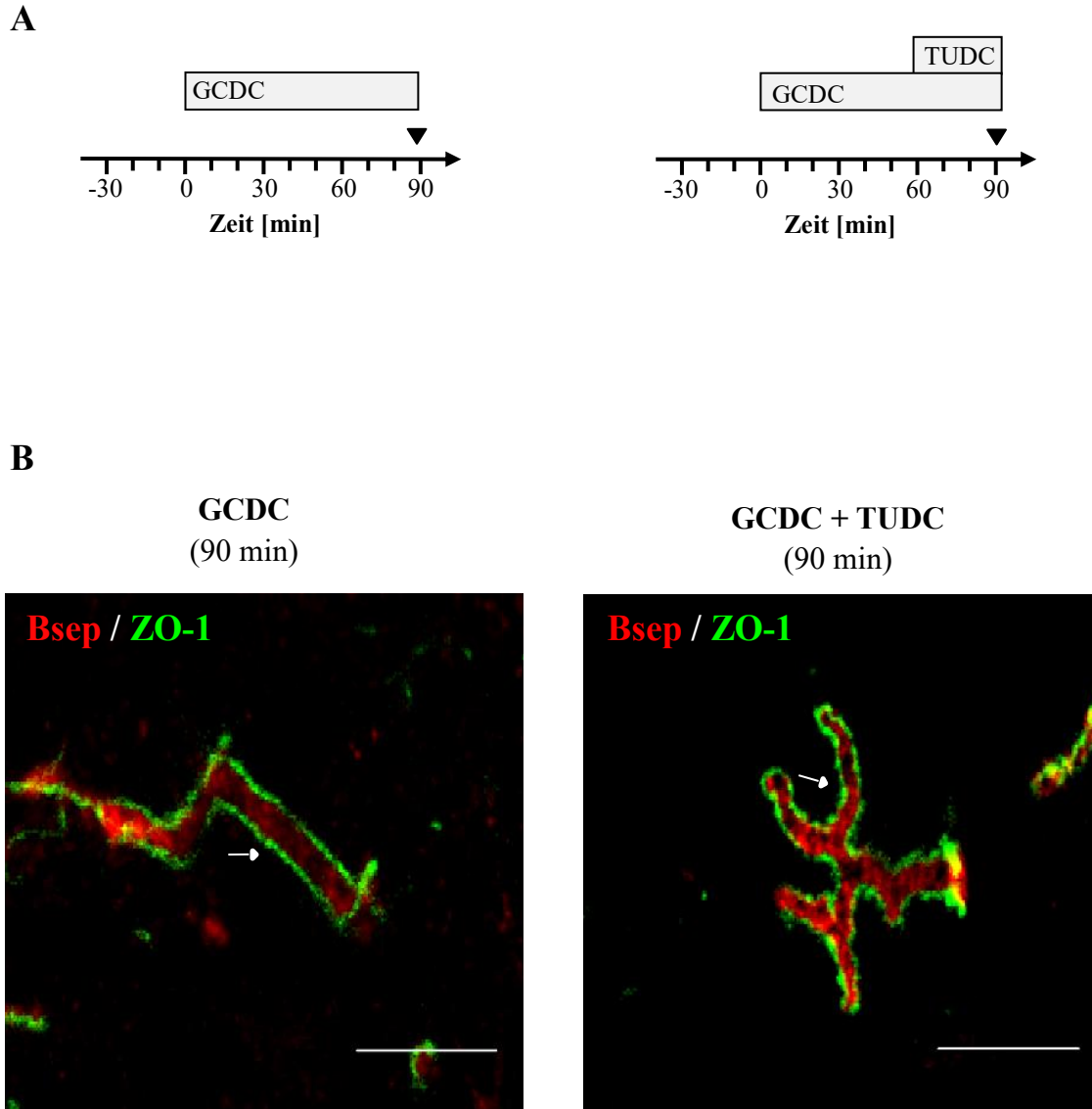


Abb. 19: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Bsep (rot) und ZO-1 (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit GCDC oder aber der Perfusion mit GCDC + TUDC.

Gemäß der oben gezeigten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit GCDC oder aber GCDC + TUDC perfundiert (A). Den Ratten wurde zu dem Zeitpunkt 90 min ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Bsep in Rot und die von ZO-1 zur Kontrolle in Grün (B). Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an. Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μm . (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

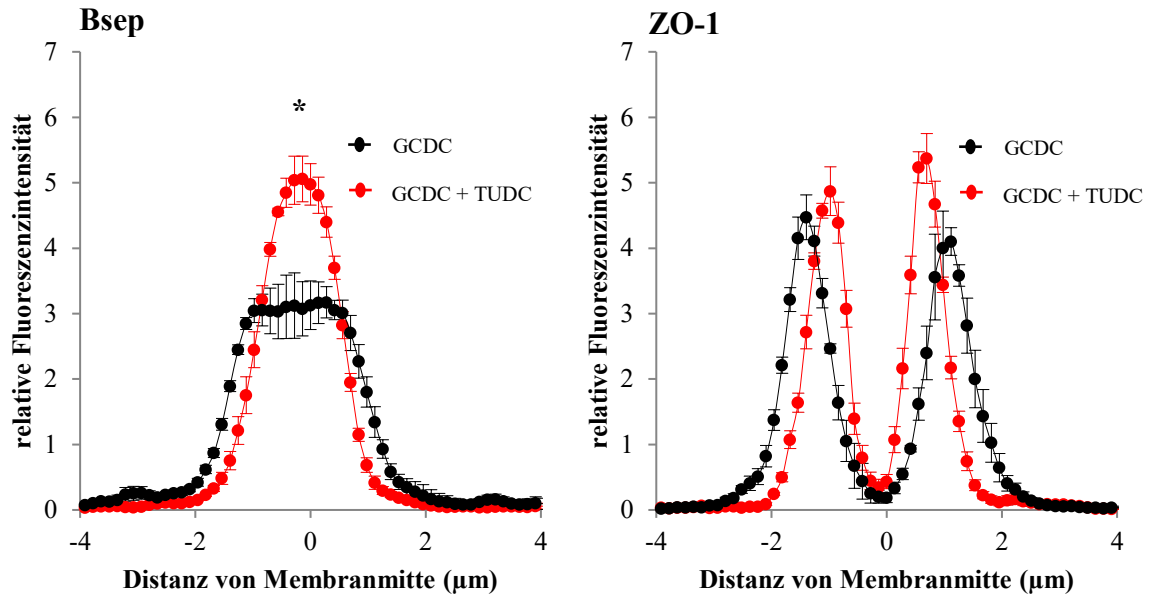


Abb. 20: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GCDC oder GCDC + TUDC.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Bsep und von ZO-1 an der kanalikulären Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.2.3 Die TUDC-abhängige Hemmung der Verbreiterung des Gallekanalikululus wird durch die Aktivierung der β_1 -Integrine vermittelt

Ziel dieses Experimentes war es zu überprüfen, ob der in Versuch 3.2.2 beschriebene Effekt der hydrophilen Gallensäure TUDC und die damit einhergehende Hemmung der GCDC-induzierten Verbreiterung des Gallekanalikululus vermittelt wird durch eine Aktivierung von β_1 -Integrinen.

Hierzu wurden Rattenlebern zunächst entweder mit dem Integrin-hemmenden Hexapeptid *GRGDSP* oder aber dem inaktiven Analogon *GRADSP* (je 10 $\mu\text{mol/l}$) perfundiert.

30 min darauf erfolgte die Zugabe der hydrophoben Gallensäure GCDC (20 $\mu\text{mol/l}$) in das Perfusionsmedium.

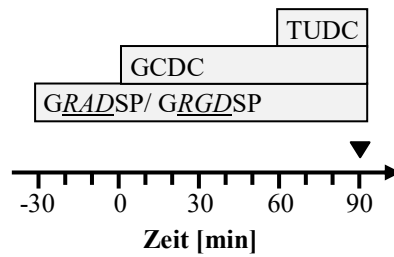
60 min nach dem Perfusionsbeginn mit GCDC wurde dem Perfusat zudem die hydrophile Gallensäure TUDC (20 $\mu\text{mol/l}$) hinzugefügt (siehe Perfusionsplan gemäß Abb. 21A).

Vergleicht man die Fluoreszenzprofile von Bsep bei beiden Versuchsbedingungen zu dem Zeitpunkt 90 min miteinander, so zeigt der Kurvenverlauf in der Perfusion mit dem Integrin-hemmenden Hexapeptid *GRGDSP* + GCDC + TUDC eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität in der Mitte des Kanalikululus und eine Verbreiterung des Fluoreszenzprofiles von Bsep im Vergleich zu der Stimulation mit *GRADSP* + GCDC + TUDC (siehe Abb. 22).

Parallel hierzu kommt es zu einer signifikanten Verbreiterung des Gallekanalikululus nach der Stimulation mit *GRGDSP* + GCDC + TUDC. Dies lässt sich aus dem Verlauf der Fluoreszenzprofile von ZO-1 schließen (siehe Abb. 22). Die kanalikuläre Verbreiterung ist eine hinreichende Erklärung für die Abflachung und Verbreiterung des Fluoreszenzprofiles von Bsep, sodass nicht von einem Ausbau des Transporters aus der kanalikulären Membran gesprochen werden kann.

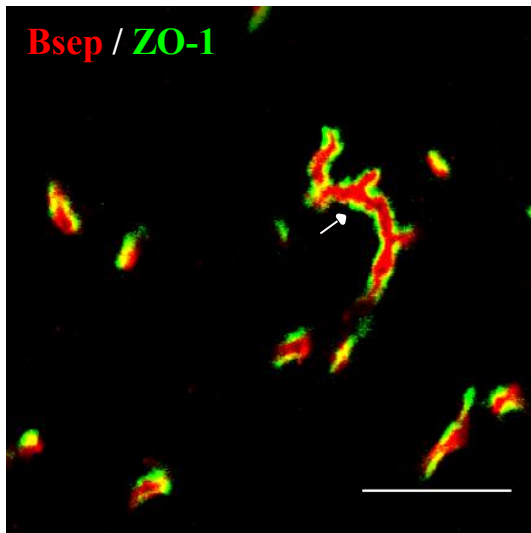
Entgegen der Beobachtungen in dem in 3.2.2 beschriebenen Versuch hebt die Stimulation mit der hydrophilen Gallensäure TUDC die GCDC-induzierte Verbreiterung des Gallekanalikululus nicht auf, wenn die β_1 -Integrine durch das Hexapeptid *GRGDSP* inhibiert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für den TUDC-induzierten Effekt an der kanalikulären Membran und die damit verbundene Hemmung der kanalikulären Verbreiterung die Aktivierung von β_1 -Integrinen notwendig ist.

A



B

GRADSP + GCDC + TUDC
(90 min)



GRGDSP + GCDC + TUDC
(90 min)

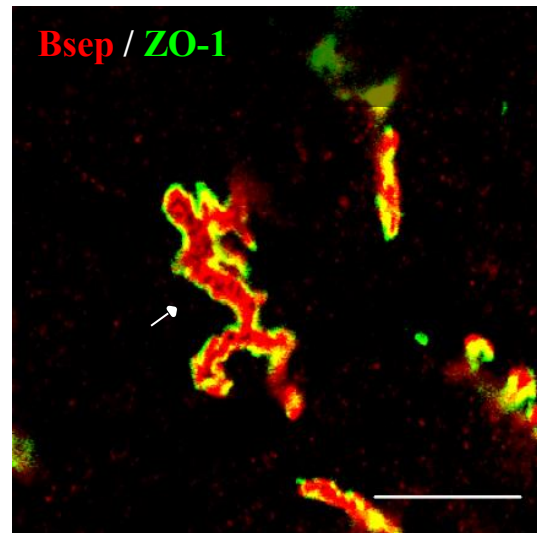


Abb. 21: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Bsep (rot) und ZO-1 (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC und GRGDSP + GCDC + TUDC.

Gemäß des oben gezeigten Perfusionsplanes wurden Rattenlebern mit GRADSP + GCDC + TUDC oder GRGDSP + GCDC + TUDC perfundiert (A). Den Ratten wurde zu dem Zeitpunkt 90 min ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Bsep in Rot und von ZO-1 zur Kontrolle in Grün (B). Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an. Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μm . (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

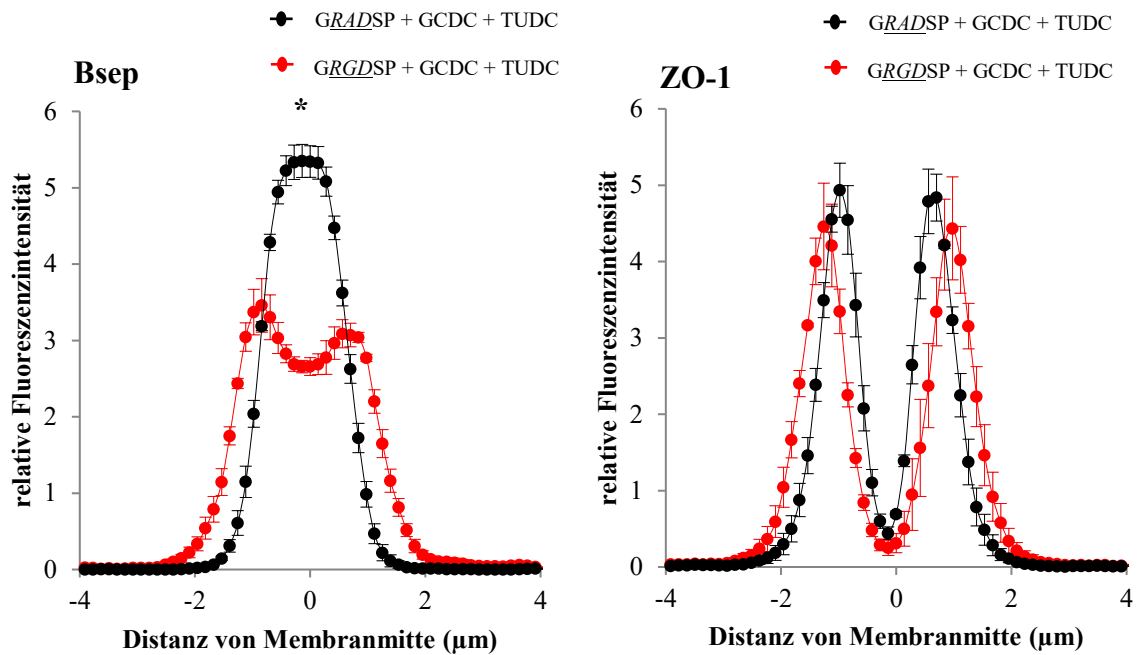


Abb. 22: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC oder GRGDSP + GCDC + TUDC.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Bsep und von ZO-1 an der kanalikulären Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 30 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.2.4 GRADSP und GRGDSP beeinflussen die GCDC-induzierte Verbreiterung des Kanalikulus nicht

In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die Hexapeptide GRADSP und GRGDSP Veränderungen an der kanalikulären Membran herbeiführen und die GCDC-induzierte kanalikuläre Verbreiterung beeinflussen. Die dazugehörigen Perfusionspläne sind in Abb. 23A aufgeführt.

Miteinander verglichen wurden zu dem Zeitpunkt 90 min die Fluoreszenzprofile von Bsep und ZO-1 der Stimulationen mit dem Hexapeptid GRADSP und GRADSP + GCDC sowie die Stimulationen mit dem Hexapeptid GRGDSP und GRGDSP + GCDC (siehe Abb. 23B und Abb. 24). Die Fluoreszenzprofile von Bsep unter alleiniger Stimulation mit GRADSP oder GRGDSP weisen eine hohe Fluoreszenzintensität in der Membranmitte auf und zeigen einen schmalen Kurvenverlauf ihrer Fluoreszenzprofile (siehe Abb. 23B und Abb. 24).

Im Vergleich dazu führt die Stimulation mit GCDC in der Perfusion mit GRADSP/GRGDSP + GCDC zu einer Abflachung in der Membranmitte sowie zu einer Verbreiterung des Fluoreszenzprofils von Bsep (siehe Abb. 23B und Abb. 24).

Unter Stimulation mit GRADSP/GRGDSP + GCDC kommt es zudem zu der bereits bekannten GCDC-induzierten Verbreiterung des Gallekanalikulus. Der Abstand zwischen den Maxima des Fluoreszenzprofiles von ZO-1 zwischen den Stimulationen nimmt signifikant zu (siehe Abb. 23B und Abb. 24). Diese Verbreiterung des Kanalikulus wird weder durch das Hexapeptid GRADSP noch durch GRGDSP beeinflusst.

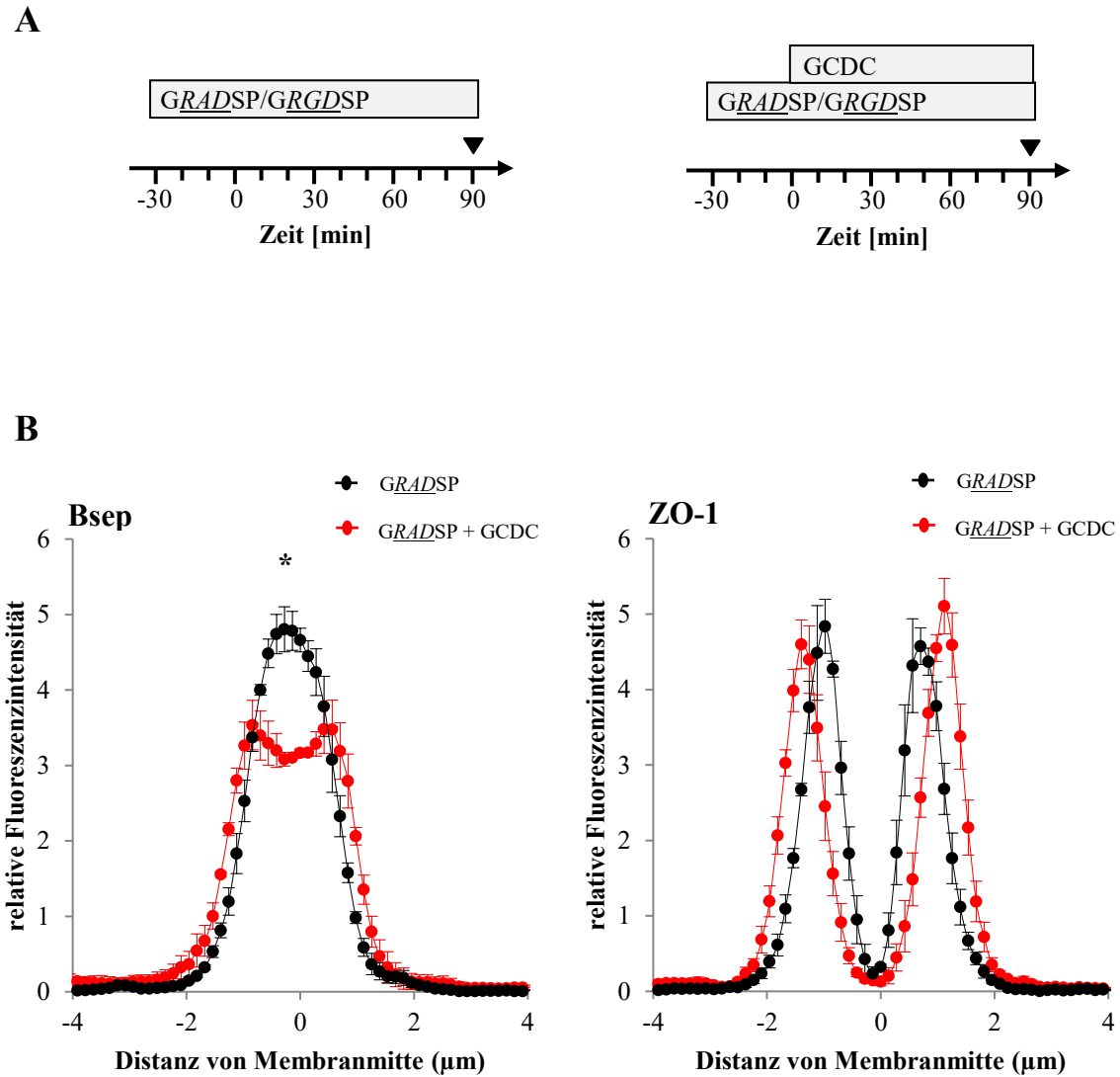


Abb. 23: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit *GRADSP* oder *GRADSP* + GCDC.

Rattenlebern wurden gemäß der angegebenen Perfusionspläne mit *GRADSP* oder *GRADSP* + GCDC perfundiert (A). Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Bsep und von ZO-1 an der kanalikulären Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

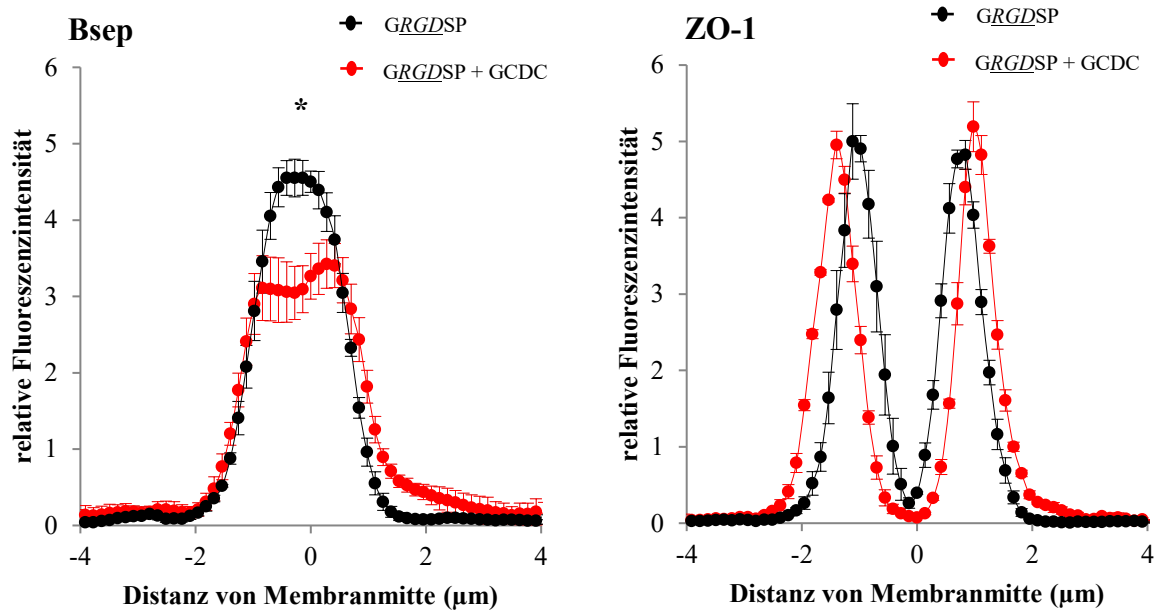


Abb. 24: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit *GRGDSP* oder *GRGDSP* + GCDC.

Rattenlebern wurden gemäß der angegebenen Perfusionspläne (siehe Abb. 23A) mit *GRGDSP* oder *GRGDSP* + GCDC perfundiert (A). Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Bsep und von ZO-1 an der kanalikulären Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.2.5 Grafische Darstellung und statistische Auswertung der kanalikulären Breite der verschiedenen Perfusionen

Wie in Abb. 25 zu sehen ist, wurde die kanalikuläre Breite jeder Perfusion der unter 3.2.1 bis 3.2.4 aufgeführten Experimente zu dem Zeitpunkt 90 min grafisch dargestellt und einer statistischen Auswertung unterzogen.

Eine Perfusion mit der hydrophoben Gallensäure GCDC führt im Vergleich zu der Perfusion mit normoosmolarem Medium zu einer signifikanten Zunahme der kanalikulären Breite.

Eine Perfusion mit GCDC + TUDC zeigt im Vergleich zu der alleinigen Perfusion mit GCDC eine signifikant geringere kanalikuläre Breite auf.

Vergleicht man die kanalikuläre Breite der beiden Perfusionen GRADSP + GCDC + TUDC und GRGDSP + GCDC + TUDC miteinander, so nimmt die kanalikuläre Breite der Perfusion mit GRGDSP + GCDC + TUDC signifikant zu.

Unverändert bleibt die kanalikuläre Breite bei der Perfusion mit GRADSP + GCDC im Vergleich zu GRGDSP + GCDC.

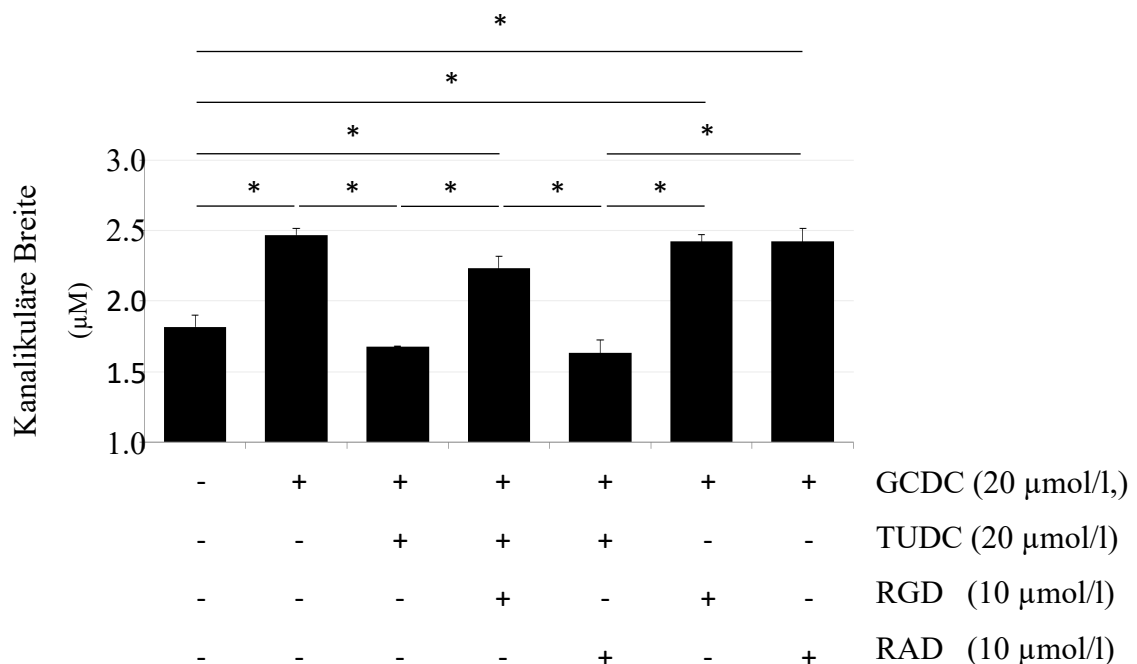


Abb. 25: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der kanalikulären Breite.

Aufgeführt ist die kanalikuläre Breite jeder Perfusion der in 3.2.1 bis 3.2.4 beschriebenen Versuche zum Zeitpunkt 90 min. Es wurde die kanalikuläre Breite zwischen den verschiedenen Perfusionen miteinander verglichen und eine statistische Auswertung erhoben. Hierzu wurde eine *one-way analysis of variance* (ANOVA) und anschließend ein Dunnet's *post hoc* Test durchgeführt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$). (entnommen und modifiziert aus Mayer *et al.*, 2019)

3.3 Effekte von Hyperosmolarität (385 mosmol/l) und Tauroursodeoxycholsäure (TUDC) auf die Plasmamembranlokalisation des Gallensalztransporters Ntcp

3.3.1 Hyperosmolare Stimulation (385 mosmol/l) führt zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran

In diesem Experiment wurde die Verteilung des Gallensalztransporters Ntcp an der basolateralen Membran untersucht und die Effekte einer Perfusion mit normoosmolarem Medium (305 mosmol/l) und hyperosmolarem Medium (385 mosmol/l) verglichen. Hierzu wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt (siehe Abb. 26 und Abb. 27).

Die mikroskopischen Bilder wurden, wie im Methodenteil beschrieben, einer densitometrischen Analyse unterzogen. Hieraus ergeben sich charakteristische Fluoreszenzprofile von Ntcp und der Na^+/K^+ -ATPase, wie sie in Abb. 28 dargestellt sind. Durch die Perfusion mit hyperosmolarem Medium ändert sich das Fluoreszenzprofil von Ntcp zu dem Zeitpunkt 60 min insofern, dass die Fluoreszenzintensität von Ntcp in der Membranmitte signifikant abnimmt. Zudem nimmt die Fluoreszenzintensität von Ntcp beidseits der Membranmitte in den lateral gelegenen Bereichen zu (siehe Abb. 28).

Diese Veränderung tritt bereits 30 min nach Perfusionsbeginn mit dem hyperosmolarem Medium auf.

Daraus resultiert, dass die Perfusion mit hyperosmolarem Medium zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran führt. Dieser Ausbau lässt sich bereits nach 30-minütiger Perfusion mit hyperosmolarem Medium nachweisen und liegt zu dem Zeitpunkt 60 min weiter vor. Dies zeigt sich auch in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die Gelbfärbung der basolateralen Membran als Folge einer Addition der Farben aus rot fluoreszierendem Ntcp und grün fluoreszierender Na^+/K^+ -ATPase nimmt ab und in dem perimembranären Bereich nimmt die Rotfärbung des Ntcp beidseits der Membranmitte zu.

Demgegenüber hat die Perfusion mit hyperosmolarem Medium keinen Effekt auf die Fluoreszenzverteilung der Na^+/K^+ -ATPase (siehe Abb. 28).

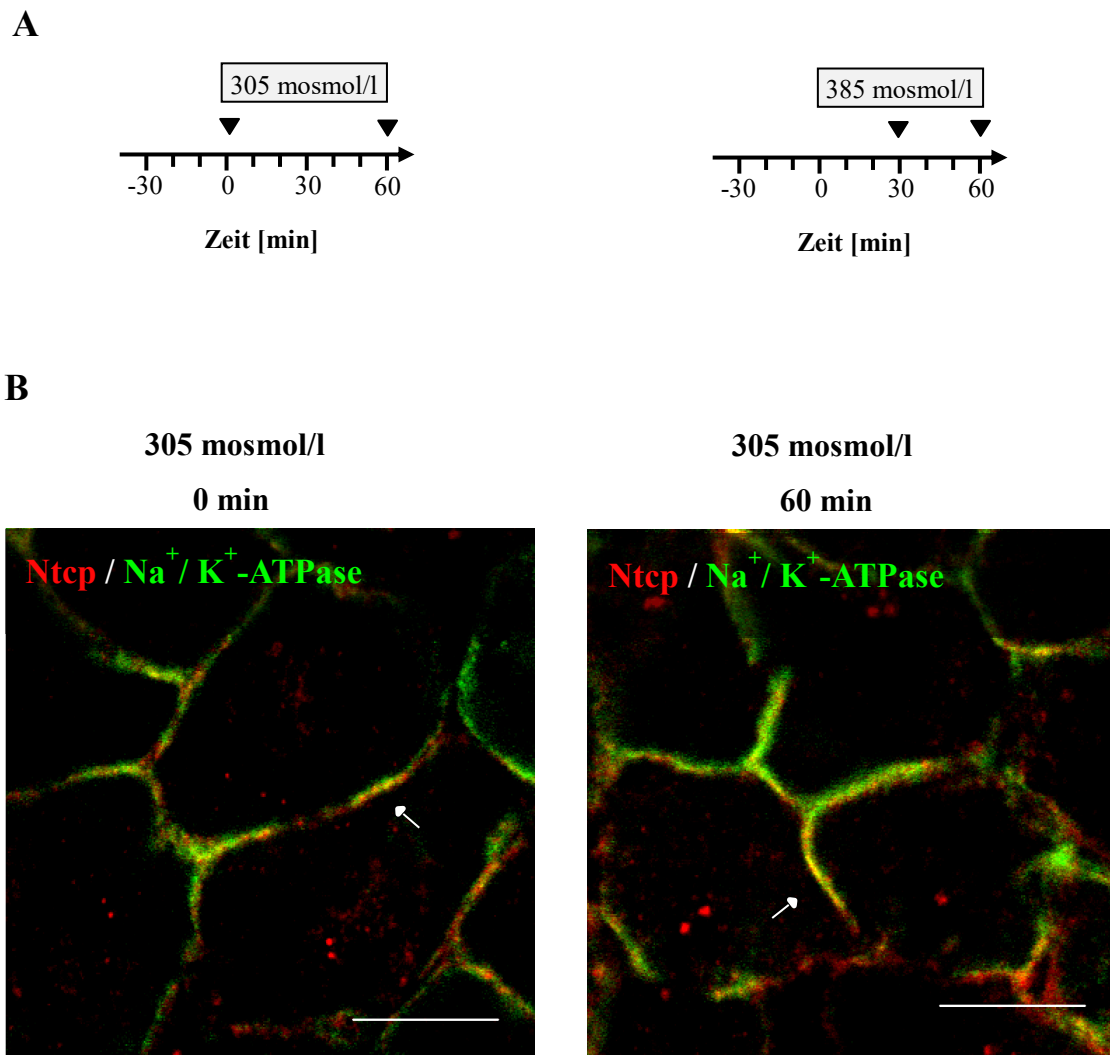


Abb. 26: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und Na⁺/K⁺-ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit normoosmolarem Medium.

Gemäß der unter A aufgeführten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit normoosmolarem Medium über einen Zeitraum von 60 min perfundiert. Den Ratten wurde zu den Zeitpunkten 0 min und 60 min jeweils ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Ntcp in Rot und die der Na⁺/K⁺-ATPase zur Kontrolle in Grün (B). Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an. Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 µm.

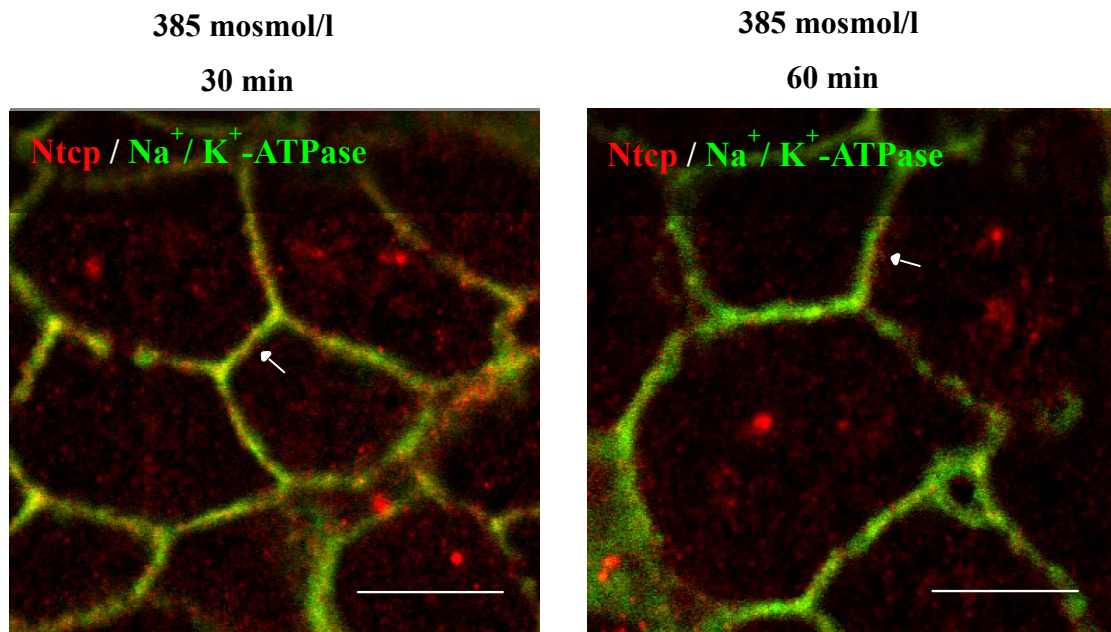


Abb. 27: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und Na^+/K^+ -ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Stimulation mit hyperosmolarem Medium.

Gemäß der unter A aufgeführten Perfusionspläne wurden Rattenlebern mit hyperosmolarem Medium über einen Zeitraum von 60 min perfundiert. Den Ratten wurde zu den Zeitpunkten 30 min und 60 min jeweils ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Ntcp in Rot und die der Na^+/K^+ -ATPase zur Kontrolle in Grün (B). Die weißen Pfeile zeigen einen für die jeweilige Stimulation repräsentativen Bereich an. Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μm .

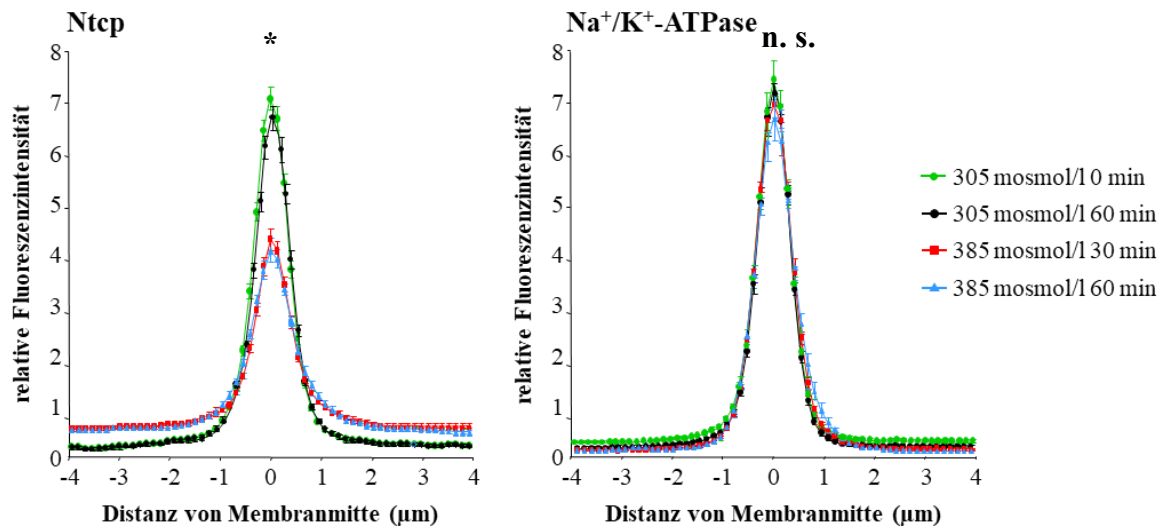


Abb. 28: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit normoosmolarem und hyperosmolarem Medium.

Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. Der Wert 0 auf der x-Achse ist dabei mit der Membranmitte gleichzusetzen. Das Fluoreszenzprofil erstreckt sich über insgesamt 8 µm, je 4 µm beidseits der Membranmitte. Die Kurvenverläufe ergeben sich aus den mathematisch normalisierten Fluoreszenzwerten je Pixel und sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$), n. s. (nicht signifikant). (entnommen und modifiziert aus Sommerfeld *et al.*, 2015)

3.3.2 Die hydrophile Gallensäure TUDC führt zu einem Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran nach durch hyperosmolarem Perfusionsmedium induziertem Ausbau

Wie unter 3.3.1 beschrieben, führt die Perfusion mit hyperosmolarem Medium (385 mosmol/l) zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran.

Dieser Ausbau zeigt sich bereits nach 30-minütiger Perfusion mit dem hyperosmolarem Medium und liegt zu dem Zeitpunkt 60 min weiter vor.

Es wurde weitergehend überprüft, ob sich die Lokalisation von Ntcp durch die Zugabe der hydrophilen Gallensäure TUDC in das Perfusionsmedium verändert.

Die Gallensäure TUDC wurde dem hyperosmolaren Medium zu dem Zeitpunkt 30 min zugefügt und die Rattenlebern damit über eine Dauer von 30 min perfundiert (siehe Abb. 29 A).

Wie dem Fluoreszenzprofil von Ntcp in Abb. 29 B zu entnehmen ist, ist die Fluoreszenzintensität von Ntcp in dem mit 385 mosmol/l + TUDC perfundierten Lebern in der Membranmitte höher und die Fluoreszenzintensität in dem Bereich um die Membranmitte geringer im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit dem hyperosmolarem Medium.

Daraus kann gefolgert werden, dass die hydrophile Gallensäure TUDC den hyperosmolarbedingten Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran aufhebt. Durch die Stimulation mit TUDC kommt es zu einem Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran.

Demgegenüber bleibt die Fluoreszenzverteilung der Na^+/K^+ -ATPase über die Stimulationen hinweg unverändert.

Die Daten zu der Stimulation mit Hyper + TUDC stammen von Frau Dr. Cantore, einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Häussinger an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

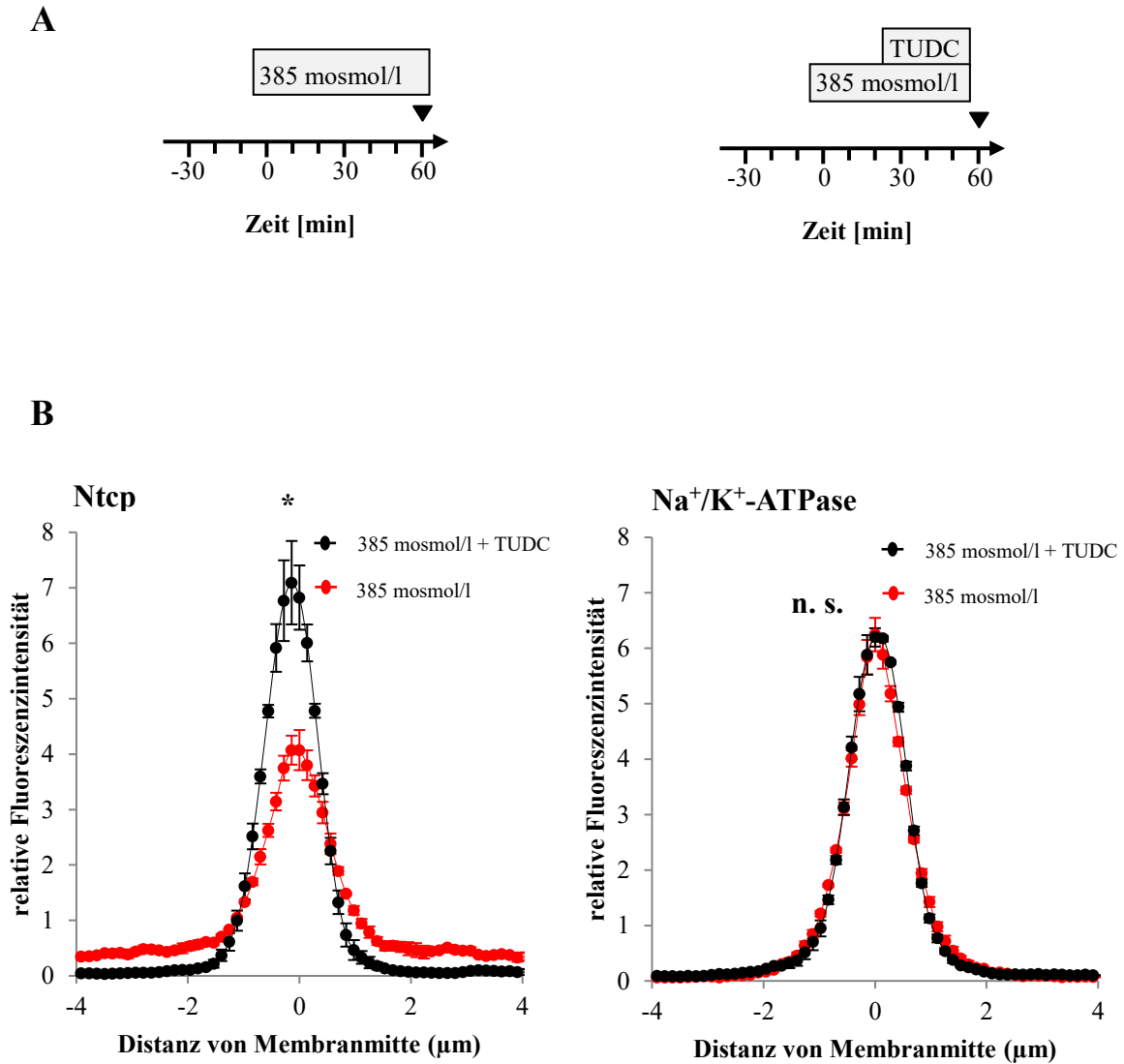


Abb. 29: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit hyperosmolarem Medium und hyperosmolarem Medium und TUDC.

Rattenlebern wurden gemäß der unter A angegebenen Perfusionspläne perfundiert. Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$), n. s. (nicht signifikant). (entnommen und modifiziert aus Sommerfeld *et al.*, 2015)

3.3.3 Der TUDC-induzierte Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran bedarf der Aktivierung von β_1 -Integrinen in perfundierten Rattenlebern

In diesem Experiment wurde dem Perfusat, mit dem die Rattenlebern perfundiert wurden, zunächst wahlweise das Integrin-hemmende Hexapeptid GRGDSP oder das inaktive Kontrollpeptid GRADSP zugefügt.

30 min darauf erfolgte die Perfusion mit hyperosmolarem Medium (385 mosmol/l). Die Stimulation mit hyperosmolarem Medium erstreckte sich über 60 min.

Zu dem Zeitpunkt 30 min wurde dem Perfusionsmedium zudem die hydrophile Gallensäure TUDC zugefügt (siehe Abb. 30 A).

Wie aus dem Kurvenverlauf des Fluoreszenzprofils von Ntcp in Abb. 31 zu erkennen ist, zeigen die Ergebnisse der Perfusion unter Verwendung des Integrin-hemmenden Hexapeptides GRGDSP mit GRGDSP + Hyper + TUDC im Vergleich zu der Perfusion mit dem Kontrollpeptid GRADSP + Hyper + TUDC eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität in der Membranmitte sowie eine Anhebung der Fluoreszenzintensität von Ntcp in dem perimembranären Bereich (siehe Abb. 31).

Demgegenüber bleibt die Fluoreszenzverteilung der Na^+/K^+ -ATPase über die Perfusionen hinweg unverändert.

Dies lässt sich auch anhand der mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 30 B erkennen. Die in Abb. 30 B gezeigten Aufnahmen, die am hochauflösenden Mikroskop Elyra (SR-SIM) angefertigt wurden, stammen von Frau Dr. Annika Sommerfeld. In die Auswertung flossen jedoch ausschließlich eigens angefertigte mikroskopische Aufnahmen, die am Laserscanningmikroskop LSM510 angefertigt wurden.

In der Perfusion unter Verwendung des Integrin-hemmenden Peptides GRGDSP kommt es zu einer Verbreiterung des Fluoreszenzprofils von Ntcp. Dies führt zudem zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität von Ntcp in den zentral gelegenen Bereichen der basolateralen Membran.

Daraus folgt, dass in den TUDC-induzierten Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran nach hyperosmolar-bedingtem Ausbau die β_1 -Integrine involviert sind. Werden die β_1 -Integrine durch das Integrin-hemmende Hexapeptid GRGDSP gehemmt, so bleibt der hyperosmolar bedingte Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp an der basolateralen Membran bestehen und der TUDC-induzierte Wiedereinbau in die basolaterale Membran, wie unter 3.3.2 gezeigt, findet nicht statt.

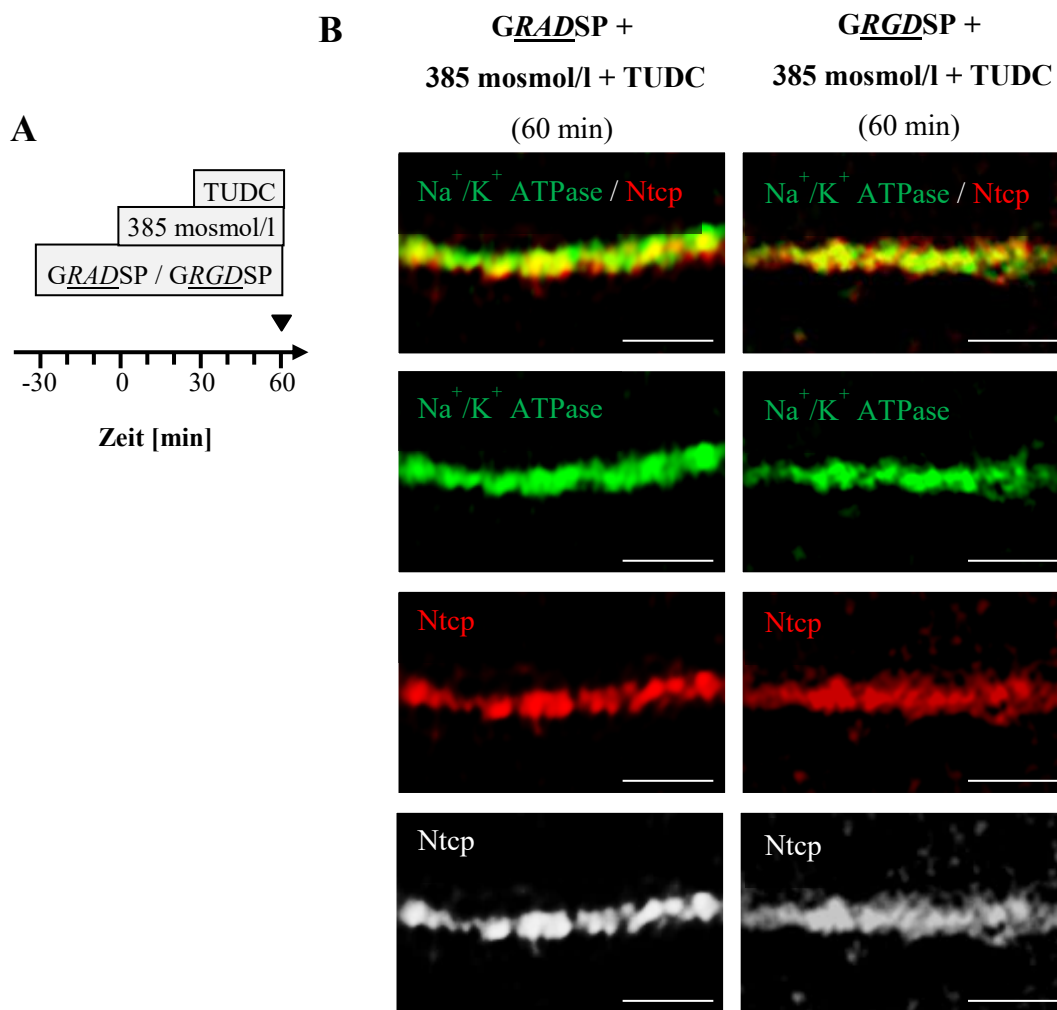


Abb. 30: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na^+/K^+ -ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit GRADSP + 385 mosmol/l + TUDC oder GRGDSP + 385 mosmol/l + TUDC.

Gemäß des oben gezeigten Perfusionsplanes unter A wurden Rattenlebern mit GRADSP + 385 mosmol/l + TUDC oder GRGDSP + 385 mosmol/l + TUDC über einen Zeitraum von 90 min perfundiert. Den Ratten wurde zum Zeitpunkt 60 min ein Leberlappen entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden immunfluoreszenzgefärbt und es wurden für die weitere Auswertung Aufnahmen an einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 510) angefertigt. Die hingegen in B gezeigten mikroskopischen Aufnahmen sind an dem hochauflösenden Mikroskop Elyra (SR-SIM) von Carl Zeiss angefertigt worden. Aufgenommen wurden diese Bilder von Frau Dr. Annika Sommerfeld. Die Aufnahmen zeigen die Immunfluoreszenz des Gallensalztransporters Ntcp in Rot und der Na^+/K^+ -ATPase zur Kontrolle in Grün (B). Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 1 μm . (entnommen und modifiziert aus Sommerfeld *et al.*, 2015)

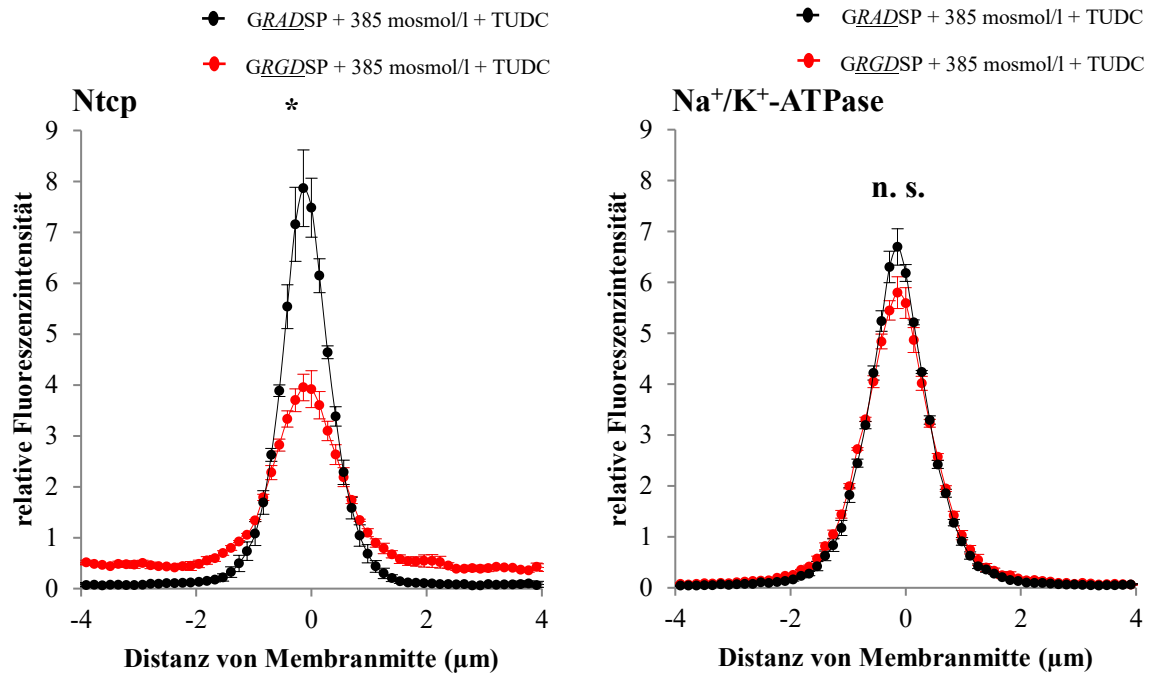


Abb. 31: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GRADSP + 385 mosmol/l + TUDC und GRGDSP + 385 mosmol/l + TUDC.

Rattenlebern wurden gemäß des in Abb. 30 A aufgeführten Perfusionsplanes perfundiert. Es wurde das Fluoreszenzprofil des Gallensalztransporters Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. In die Auswertung flossen pro Versuchsbedingung 3 voneinander unabhängige Leberpräparationen. Pro Leberpräparation wurden 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. * statistisch signifikant ($p < 0.05$), n. s. (nicht signifikant). (entnommen und modifiziert aus Sommerfeld *et al.*, 2015)

4 Diskussion

4.1 Mechanismus des GCDC-induzierten Ausbaus des Gallensalztransporters Ntcp

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit kurzzeitregulatorischen Mechanismen in Bezug auf die für die Gallensalzhomöostase bedeutsamen Gallensalztransporter Ntcp an der basolateralen Membran sowie Bsep an der kanalikulären Membran in perfundierten Rattenlebern.

Die Aufrechterhaltung der Gallensalzhomöostase ist von großer Bedeutung, da Gallensalze einen biologischen Effekt auf die Leber und weitere Organe des Gastrointestinaltrakts ausüben (1).

Ging man in der Vergangenheit davon aus, dass Gallensalze lediglich detergente Moleküle sind, die für die intestinale Resorption von Cholesterol, fettlöslichen Vitaminen oder aber Lipiden benötigt werden, so ist heute bekannt, dass Gallensalze zudem als regulatorische Moleküle fungieren, die Einfluss auf zelluläre Signalwege und nukleäre Rezeptoren nehmen (1). Eine zentrale Rolle in der Gallensalzhomöostase nehmen die Gallensalztransporter in der hepatozytären Membran ein. Änderungen ihres Aktivitätsniveaus beeinflussen die Gallensalzhomöostase (1). Bei der Regulation der Gallensalztransporter unterscheidet man zwischen der Kurzzeit- und der Langzeitregulation.

Zu der Kurzzeitregulation zählt man Änderungen in der Verfügbarkeit des jeweils transportierten Substrates (64), kovalente Modifikationen an den Gallensalztransportern (49) oder aber den schnellen Ein- und Ausbau der Gallensalztransporter aus der basolateralen und/oder kanalikulären Membran der Hepatozyten (3, 66, 81).

Langzeitregulatorische Veränderungen und Anpassungen der Gallensalztransporter hingegen finden auf transkriptioneller und translationaler Ebene statt (28, 30, 82, 83).

Zunächst wurde die Wirkung der hydrophoben Gallensäure GCDC auf die Plasmamembranlokalisation des Gallensalztransporters Ntcp untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass GCDC innerhalb von 60 min zu einem signifikanten Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran führt.

In der Publikation Mayer *et al.*, 2019 (84) wurde zudem der zugrunde liegende Signalweg aufgeklärt.

Es ist bekannt, dass GCDC in kultivierten Rattenhepatozyten zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase führt und es hierdurch zu einer Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt (85). Des Weiteren zeigten die Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Häussinger, dass es in perfundierten Rattenlebern durch die Stimulation mit hyperosmolarem Medium (385 mosmol/l) über die Aktivierung der NADPH-Oxidase und die Bildung von ROS zu einer Aktivierung der Kinasen Yes und Fyn aus der Familie der Src-Kinasen kommt (4).

In Mayer *et al.*, 2019 (84) konnte gezeigt werden, dass die Src-Kinasen Yes und Fyn durch die hydrophobe Gallensäure GCDC via NADPH-Oxidase und die Ausbildung von ROS aktiviert werden. Weitere Ergebnisse lieferten Hinweise auf die Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) im GCDC-induzierten Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran (84).

Zudem scheint lediglich die Src-Kinase Fyn und nicht Yes in den Prozess des GCDC-induzierten Ausbaus von Ntcp aus der basolateralen Membran involviert zu sein (84).

Zusammengefasst sind die PKC ζ , die NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Bildung und die Aktivierung der Src-Kinase Fyn am GCDC-induzierten Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran beteiligt (84).

Neben GCDC führt auch die hydrophobe Gallensäure Taurochenodeoxycholsäure (TCDC) zu einem Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran (54). Der hier zugrundeliegende Mechanismus scheint sich aber von dem des GCDC-induzierten Ausbaus von Ntcp zu unterscheiden. Der TCDC-induzierte Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran wird über eine Aktivierung von PKC-Isoformen sowie die Aktivierung der Proteinphosphatase 2B vermittelt (54). Der entscheidende Unterschied zu dem GCDC-induzierten Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran ist, dass bei dem TCDC-induzierten Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran keine ROS-Bildung stattfindet (54). Bei dem TCDC-bedingten Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran kommt es im Zytoplasma der Hepatozyten zu einer Kollokalisierung von Ntcp mit dem *Early Endosomal Antigen 1* (EEA-1). Dies spricht für eine Endozytose von Ntcp in frühe Endosomen. (54).

Der Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran dient möglicherweise dazu, dass es in einer cholestatischen Stoffwechselsituation nicht zu einer intrazellulären Akkumulation potenziell toxischer Gallensäuren kommt (86).

4.2 Mechanismus der choloretischen Wirkung von TUDC nach GCDC-induziertem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp

Auch wenn die hydrophile Gallensäure TUDC seit mehreren Jahrzehnten Einsatz im klinischen Alltag in der Behandlung cholestatischer Krankheitsbilder findet, so sind die der choloretischen und damit hepatoprotektiven Wirkung zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bisher weitgehend ungeklärt.

Bekannt war bislang, dass TUDC nur in geringem Umfang die klassischen Gallensalzrezeptoren Farnesoid-X-Rezeptor (Fxr) und den Transmembrane G Proteingekoppelten Gallensalzrezeptor (Tgr5) aktiviert (87).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wirkt TUDC über eine Aktivierung der β_1 -Integrine sowie über eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) dem GCDC-induzierten Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran entgegen.

Die Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Häussinger haben in der Vergangenheit gezeigt, dass die β_1 -Integrine als Osmosensoren der Hepatozyten fungieren. Hypoosmolarität wie auch Insulin vermitteln eine Schwellung des Hepatozyten (75, 78). Die Zellschwellung bewirkt nachfolgend eine Aktivierung von β_1 -Integrinen. Der darauf folgende Signalweg beinhaltet die fokale Adhäsionskinase (FAK), c-Src, den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Erks und die $p38^{MAPK}$ (75, 88). Dies mündet in eine choloretische Stoffwechsellage, in der es zu einem Einbau der Gallensalztransporter Bsep und Mrp2 in die kanalikuläre Membran kommt (66).

Des Weiteren führt eine Stimulation mit Harnstoff zu einer Aktivierung der β_1 -Integrine in perfundierten Rattenlebern (89). Im Gegensatz zu der oben genannten zellschwellungsassoziierten Aktivierung der β_1 -Integrine nimmt der Hydratationszustand der Hepatozyten bei Stimulation mit Harnstoff nicht zu (89).

Dieser Arbeit vorausgehende Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Häussinger konnten des Weiteren zeigen, dass die β_1 -Integrine nicht nur als Osmosensoren fungieren, sondern auch TUDC binden und hierüber choloretische Wirkungen vermitteln (10).

In molekulardynamischen Simulationen des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins zeigte sich, dass die Bindung von TUDC zu einer Konformationsänderung der Kopfreion der β_1 -Untereinheit führt, die mit der Aktivierung der Integrine in Verbindung gebracht wird (10). Diese tritt bereits eine Minute nach Perfusionsbeginn mit TUDC auf. Die Aktivierung der Integrin- β_1 -

Untereinheit durch TUDC erfolgt dabei intrazellulär. Folglich muss TUDC zunächst durch den Gallensalztransporter Ntcp in die Leberzelle aufgenommen werden (10).

Während die schwellungsassoziierte Aktivierung der β_1 -Integrine in der hepatozytären Membran auftritt, erfolgt die TUDC-induzierte Aktivierung der β_1 -Integrine im Zytosol der Hepatozyten (10).

In nicht-cholestatischen Rattenlebermodellen schließt sich an die Aktivierung der β_1 -Integrine eine Signalkaskade an, die unter Beteiligung von c-Src, FAK, EGFR, der PI3-Kinase sowie von MAP-Kinasen abläuft (75).

Die hydrophile Gallensäure TUDC verhindert die GCDC-induzierte Bildung von ROS und die dadurch vermittelte Aktivierung von Fyn (84). Ebenso wirkt TUDC der hyperosmotisch-vermittelten ROS-Bildung entgegen (12).

Des Weiteren wirkt Ursodeoxycholsäure der ROS-Bildung durch Deoxycholsäure entgegen. Hierbei verhindert Ursodeoxycholsäure eine Veränderung der Membranpermeabilität der Mitochondrien (90).

Wie in Mayer *et al.*, 2019 (84) gezeigt, wirkt TUDC über die Aktivierung von β_1 -Integrinen und der Proteinkinase A der GCDC-induzierten Aktivierung von Fyn entgegen. Ob die choleretische Wirkung von TUDC hierbei in erster Linie auf einem antioxidativen Effekt beruht, ist gegenwärtig unklar.

Wie bereits im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt TUDC zudem über die Aktivierung von β_1 -Integrinen zu einer Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (80).

Der choleretische Effekt von cAMP ist gut bekannt. Durch cAMP kommt es zu einem Einbau von Ntcp in die basolaterale Membran (44). Des Weiteren führt cAMP zu einem Einbau der Gallensalztransporter Mrp2 (91) sowie von Bsep (92) in die kanalikuläre Membran.

Der choleretische Effekt von cAMP scheint dabei zunächst über die PKA-assoziierte Aktivierung der PI3-Kinase abzulaufen. Sodann schließt sich die Aktivierung der Akt-Kinase sowie die Aktivierung verschiedener PKC-Isoformen (PKC δ , PKC ζ) an. Dies führt letztlich zu einem Einbau von Ntcp in die basolaterale Membran (43, 46–48).

Des Weiteren ist der cAMP-induzierte Einbau von Ntcp in die basolaterale Membran mit der Dephosphorylierung eines Serinrestes von Ntcp assoziiert (49, 50). cAMP aktiviert die Proteinphosphatase 2B und dephosphoryliert Ntcp an Serin²²⁶ (53).

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der TUDC-vermittelte Einbau von Ntcp in die basolaterale Membran nicht nur darauf basiert, dass die GCDC-induzierte Aktivierung von

Fyn und die damit einhergehende Phosphorylierung von Ntcp verhindert wird, sondern zudem auf einer β_1 -Integrin-abhängigen Aktivierung von cAMP basiert.

Denn wie in Mayer *et al.*, 2019 (84) gezeigt, wird die Reinsertion von Ntcp in die basolaterale Membran durch die Stimulation mit TUDC in vorher mit der hydrophoben Gallensäure GCDC perfundierten Rattenlebern sowohl durch die Blockade der β_1 -Integrine als auch durch die Blockade der PKA verhindert.

4.3 Der Effekt von GCDC auf den Gallensalztransporter Bsep und den Gallekanalikulus

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure GCDC zu einer Verbreiterung des Fluoreszenzprofils des Gallensalztransporters Bsep sowie zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität von Bsep in der Mitte des Kanalikulus. Parallel dazu führt die Stimulation mit GCDC zu einer signifikanten Verbreiterung des Gallekanalikulus (84).

Die Verbreiterung der Gallekanalikuli vermag dabei die Verbreiterung des Fluoreszenzprofils von Bsep sowie die Abnahme der Fluoreszenzintensität von Bsep in der Membranmitte *per se* zu erklären, sodass nicht von einem Ausbau des Gallensalztransporters Bsep aus der kanalikulären Membran nach Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure GCDC gesprochen werden kann.

Im Gegensatz hierzu führt die Stimulation mit hyperosmolarem Medium (385 mosmol/l) zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Bsep aus der kanalikulären Membran (4).

Ebenso führt eine Stimulation mit hyperosmolarem Medium zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Mrp2 aus der kanalikulären Membran (93).

Die dem Ausbau von Bsep und Mrp2 zugrundeliegende Signalkaskade nach Stimulation mit hyperosmolarem Medium beinhaltet die NADPH-Oxidase, die Bildung von ROS sowie die Aktivierung der Kinase Fyn (4). Eine Phosphorylierung des Cortactins vermindert die Interaktion zwischen dem Aktinzytoskelett und Cortactin (94). Cortactin ist am hyperosmolar bedingten Ausbau der Gallensalztransporter Bsep und Mrp an der kanalikulären Membran beteiligt (4).

Eine Dilatation der Gallekanalikuli wurde auch im Tauroolithocholsäure-induzierten Cholestasemodell der Rattenleber bzw. in primären Rattenhepatozyten für die Stimulation mit Tauroolithocholsäure in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt (95–97).

Eine kanalikuläre Dilatation konnte in verschiedenen Leberschädigungsmodellen in der Ratte beobachtet werden. Hierzu zählen das medikamenteninduzierte Cholestasemodell mit Chlorpromazin und Estradiol-17 β -D-Glukuronid (98) sowie die kanalikuläre Dilatation bei ischämiebedingtem Reperfusionsschaden (IRI) (99).

Über den zugrunde liegenden Mechanismus der GCDC-induzierten Erweiterung der Kanalikululi lässt sich gegenwärtig nur spekulieren. Denkbar ist beispielsweise, dass es durch oxidativen Stress zu zytoskelettalen Veränderungen der Hepatozyten kommt (84).

Die funktionelle Konsequenz der GCDC-induzierten Transporterexpressionsänderung ist die Hemmung der kanalikulären Gallensäuresekretion in der Rattenleber (84).

4.4 Der Effekt von TUDC auf den Gallensalztransporter Bsep und den Gallekanalikulus

Die Stimulation mit der hydrophilen Gallensäure TUDC hebt die unter 4.3 beschriebenen Auswirkungen der Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure GCDC auf den Gallensalztransporter Bsep sowie auf die kanalikuläre Membran auf.

So führt die Stimulation mit TUDC wiederum zu einer Verringerung der Kanalikulusbreite. Die Wirkung von TUDC ist dabei abhängig von der Aktivität der β_1 -Integrine. Wurden die β_1 -Integrine vor der Stimulation mit TUDC durch das Hexapeptid *GRGDSP* gehemmt, so bleibt der TUDC-vermittelte Effekt aus.

Eine Verschmälerung der Gallekanalikuli als Folge einer Stimulation mit TUDC konnte auch bei medikamenteninduzierter Cholestase sowie nach ischämisch bedingtem Reperfusionsschaden der Leber beobachtet werden, nachdem es zuvor zu einer kanalikulären Dilatation gekommen war (98, 99).

In perfundierten Rattenlebern, die nur mit Tauroolithocholsäure (TLC) oder in Kombination mit Tauroursocholsäure oder Taurodehydrocholsäure perfundiert werden, zeigt sich eine Dilatation der Kanalikululi (100). Perfundiert man die Rattenlebern im Rahmen der TLC-induzierten Cholestase zudem mit den Gallensäuren Taurocholsäure, Taurohyocholsäure oder aber Tauroursodeoxycholsäure, so wirken diese drei Gallensäuren jeweils der kanalikulären Dilatation durch TLC entgegen (100).

Die Gallensäure TUDC führt zu einer Zunahme der Taurocholatrekretion in die Gallekanalikuli (75). Dies ist auf den Einbau von Bsep in die kanalikuläre Membran zurückzuführen (75). Zu Beginn der Signalkaskade kommt es zu einer Aktivierung der Integrine mit anschließender Aktivierung von FAK und von Src (75).

Sodann folgt die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK 1/2 und p38^{MAPK} (8).

Die Aktivierung der ERKs läuft unter Beteiligung der PI3-Kinase sowie Ras ab und bildet so den PI3K/Ras/Erk-Signalweg (101).

Wird die p38^{MAPK} durch TUDC aktiviert, so kann an den Golgi-Apparat gebundenes BSEP rekrutiert werden und es beginnt der Transport vom Golgi-Apparat in Richtung kanalikulärer Membran mit einem folgenden Einbau von BSEP in die kanalikuläre Membran (63). Der Einbau von Bsep in die kanalikuläre Membran wird durch Mikrotubuli bewerkstelligt (63).

4.5 Mechanismus des hyperosmolar bedingten Ausbaus des Gallensalztransporters Ntcp

Es ist bekannt, dass das hepatozelluläre Volumen einen großen Einfluss auf den transzellulären Transport gelöster Substanzen, wie z.B. konjugierte Gallensäuren oder Glutathion-Konjugate ausübt (11). Das hepatozelluläre Volumen ist ein Parameter, der sich innerhalb weniger Minuten unter dem Einfluss von Hormonen, Nahrungsmitteln oder oxidativem Stress ändern kann (11). Daraus folgt, dass der Hydratationszustand der Hepatozyten von funktioneller Relevanz für die Galleformation ist (11).

Der Hydratationszustand der Hepatozyten hat auch Einfluss auf die Lokalisation der Gallensalztransporter der Hepatozyten.

So war bisher bekannt, dass eine hyperosmolar bedingte Zellschrumpfung zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Bsep aus der kanalikulären Membran führt (66). Die Folge ist der Transfer und die Lagerung von Bsep in einem intrazellulären vesikulären Kompartiment (66). Zellschwellung hingegen führt zu einem Einbau von Bsep in die kanalikuläre Membran (66).

Unter normoosmolaren Bedingungen sind die Gallensalztransporter Bsep und Mrp2 sowohl in die kanalikuläre Membran eingebaut und befinden sich zudem in Vesikeln im Zytoplasma der Hepatozyten in unmittelbarer Nähe der kanalikulären Membran (4).

Weiter führt eine hyperosmolar bedingte Zellschrumpfung der Leberzelle zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Mrp2 aus der kanalikulären Membran, wohingegen die Stimulation mit hypoosmolarem Medium und anschließend einsetzender Zellschwellung zu einem Einbau von Mrp2 in die kanalikuläre Membran führt (93).

Die Osmoregulation der Gallensalztransporter lässt sich auch in der Langzeitregulation beobachten. Hypoosmolarität führt zu einem Anstieg der mRNA sowie der

Proteinexpression von Bsep und Mrp2 (11). Hyperosmolarität hingegen führt zu einer Abnahme der mRNA und der Proteinexpression von Bsep und Mrp2 (11).

In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass die hyperosmolare Stimulation perfundierter Rattenlebern nicht nur an der kanalikulären Membran zu einem Transporterausbau führt, sondern auch an der basolateralen Membran zu beobachten ist. So führt die Stimulation mit hyperosmolarem Medium innerhalb von 30 min zu einem Ausbau des Gallensalztransporters Ntcp aus der basolateralen Membran. Dieser Ausbau ist auch noch zu dem Zeitpunkt 60 min zu beobachten.

Eine signifikante Abnahme der mRNA von Ntcp nach Stimulation mit hyperosmolarem Medium konnte ab einer Stimulationsdauer von 180 min und mehr beobachtet werden (12). Der Ausbau von Bsep und Mrp2 aus der kanalikulären Membran in Folge einer hyperosmotischen Stimulation wird durch oxidativen Stress vermittelt (4). So kommt es durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase zu einer Bildung von ROS (4). Dies führt unter anderem zu einer Aktivierung der Src-Kinase Fyn (4). Die Aktivierung von Fyn wiederum führt zu einer Phosphorylierung von Cortactin und in der Folge zu einer Reduktion der Interaktion zwischen Cortactin und dem Aktinzytoskelett, wodurch womöglich der Ausbau der Gallensalztransporter Bsep und Mrp2 aus der kanalikulären Membran induziert wird (4, 102).

Der hyperosmotisch bedingte Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran wird mit einer Aktivierung der NADPH-Oxidase durch die PKC ζ und der darauf folgenden Ausbildung von ROS in Verbindung gebracht (12). Hierüber wird die Src-Kinase Fyn aktiviert (12).

Eine hyperosmotische Stimulation führt über die Aktivierung von Fyn nicht nur zu einem Ausbau von Bsep und Mrp2 an der kanalikulären Membran, sondern auch zu einem Ausbau von Ntcp an der basolateralen Membran (12).

Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine koordinierte Regulation der Gallensäureaufnahme an der basolateralen Membran sowie der Gallensäurenexkretion an der kanalikulären Membran handelt, die die Akkumulation potenziell toxischer Gallensäuren in den Hepatozyten verhindern soll (12).

4.6 Mechanismus der TUDC-vermittelten Hemmung des hyperosmolar-induzierten Ntcp-Ausbaus aus der basolateralen Membran

Eine Zellschwellung durch hypoosmotische Stimulation führt über den PI3K-Signalweg zu einem Einbau von Ntcp in die basolaterale Membran und somit zu einer gesteigerten Aufnahme der Gallensäure Taurocholat in die Hepatozyten (45).

Des Weiteren führt cAMP durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen Calmodulinkinase-vermittelt zu einer Aktivierung der Proteinphosphatase 2B (PP2B). Die PP2B führt zu einer Dephosphorylierung von NTCP und dadurch zu einem Einbau von NTCP in die basolaterale Membran (53).

Integrine bilden einen Kontakt zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix aus. Kommt es durch osmotische Veränderungen zu einer mechanischen Spannung auf die Integrine, so vermag dies das Integrin-System zu aktivieren und somit Zellfunktionen zu regulieren. Man spricht diesbezüglich von *Tensegrität* (75, 103).

Hypoosmolare Zellschwellung führt zu einer Aktivierung der β_1 -Untereinheit der Integrine in der Plasmamembran (11). Dies aktiviert FAK, c-Src, den EGFR sowie die MAP-Kinasen Erk und p38^{MAPK} (11).

Werden mit Taurocholsäure-perfundierte Rattenlebern ($100\mu\text{mol/l}$) zusätzlich mit TUDC ($20\mu\text{mol/l}$) stimuliert, so kommt es TUDC-assoziiert zu einer Zellschwellung (104). Eine alleinige Stimulation mit TUDC hingegen hat keinen signifikanten Einfluss auf das Zellvolumen der Hepatozyten (105).

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die hydrophile Gallensäure TUDC innerhalb von 30 min zu einem Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran führt, nachdem es zuvor durch hyperosmolare Stimulation zu einem Ausbau des Transporters aus der basolateralen Membran gekommen ist. An diesem Wiedereinbau sind β_1 -Integrine maßgeblich beteiligt. Wurden die β_1 -Integrine durch das Hexapeptid GRGDSP gehemmt, so blieb der TUDC-vermittelte Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran aus. Das inaktive Kontrollpeptid GRADSP hingegen hatte keinen Einfluss auf die choleretische Wirkung von TUDC, sodass es TUDC-vermittelt zu einem Wiedereinbau des Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran kam. Die alleinige Stimulation mit den Hexapeptiden GRADSP und GRGDSP hat keine Auswirkung auf die Lokalisation des Gallensalztransporters Ntcp an der basolateralen Membran.

Die choleretische Wirkung von TUDC wird durch eine Aktivierung der PKA vermittelt. Wurde die PKA mittels H89 gehemmt, so blieb der TUDC-vermittelte Wiedereinbau des

Gallensalztransporters Ntcp in die basolaterale Membran nach hyperosmolar bedingtem Transporterausbau aus (12).

TUDC führt zudem über die Aktivierung der β_1 -Integrine zu einer schnellen Bildung von cAMP (80). Zusammengefasst führt TUDC zunächst zu einer intrazellulären Aktivierung von β_1 -Integrinen (10). Hierdurch kommt es zu einer Ausbildung von cAMP und außerdem zu einer Aktivierung der PKA (12). Die PKA wiederum hemmt die Bildung von ROS, wodurch die aktivierende Phosphorylierung der Src-Kinase Fyn ausbleibt (12).

Inwieweit der PI3K-Signalweg in dem oben beschriebenen TUDC-induzierten Wiedereinbau von Ntcp in die basolaterale Membran eine Rolle spielt, ist gegenwärtig nicht bekannt.

Des Weiteren führt TUDC auch zu einem Wiedereinbau des Gallensalztransporters Bsep in die kanalikuläre Membran nach hyperosmolar bedingtem Ausbau des Transporters (12).

4.7 Kritische Betrachtung der Eignung der Gallensäure Ursodeoxycholsäure im Rahmen der Behandlung von cholestatischen Lebererkrankungen

Ursodeoxycholsäure (UDCA) wird in der Behandlung der primären biliären Zirrhose (PBC) und der primären sklerosierenden Cholangitis (PSC) und weiteren cholestatischen Lebererkrankungen eingesetzt (5).

Zu hohe Dosen von UDCA (28-30mg/kg/Tag) sind nicht nur ineffektiv bei der Behandlung der PSC, sondern haben auch eine schädigende Wirkung. Es stieg bei diesen hohen Dosen sowohl die Rate an Varizen als auch die Zahl der für eine Lebertransplantation gelisteten Patienten an (63% in der UDCA-Gruppe versus 37% in der Kontrollgruppe) (106).

UDCA beeinflusst *in vivo* die Expressionsrate der Transporter-Proteine auf der Ebene der Transkription kaum. Die Wirkung scheint maßgeblich auf einer posttranskriptionellen Modifikation der Expression der Gallensalztransporter zu beruhen (107).

Ein weiterer Effekt von UDCA, der sich protektiv auf Hepatozyten und Cholangiozyten auswirken könnte, ist die Stimulation der biliären Sekretion von Bikarbonat durch UDCA (18). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der von Beuers *et al.* aufgestellten Hypothese des „biliären HCO₃⁻-Schutzschirms“. Durch die biliäre Sekretion von HCO₃⁻ in der humanen Leber wird ein alkalisches Milieu an der apikalen Oberfläche der Hepatozyten und Cholangiozyten geschaffen (108). Der daraus resultierende alkalische pH-Wert wiederum führt zu einer Deprotonierung der Gallensäuren. Somit können diese als negativ geladene Moleküle (Gallensalze) nicht mehr die Zellmembran von Cholangiozyten und Hepatozyten auf Transporter-unabhängigem Weg überwinden (108). Eine funktionelle Beeinträchtigung dieses Schutzschirms verstärkt die Vulnerabilität von Cholangiozyten und periportal gelegenen Hepatozyten gegenüber apolaren hydrophoben Gallensäuren (108).

4.8 Ursodeoxycholsäure im Kontext weiterer choleretisch und zytoprotektiv wirkender Substanzen

Zunächst sei die Gallensäure 24-Norursodeoxycholsäure (*norUDCA*) erwähnt, ein UDCA-Derivat mit C₂₃-Grundgerüst, die eine Methylengruppe weniger aufweist als UDCA (109). *norUDCA* wird passiv von Cholangiozyten im Austausch gegen Bikarbonat absorbiert (109). Man spricht diesbezüglich von dem cholehepatischen Shunt im Unterschied zu dem enterohepatischen Kreislauf, den die Gallensäuren normalerweise durchlaufen (109). Weiter ist *norUDCA* hydrophiler als UDCA und dadurch weniger toxisch für Hepatozyten und Cholangiozyten (110). *norUDCA* wirkt der biliären Zytotoxizität entgegen. In *Mdr2/Abcb4-Knock-out*-Mäusen (*Mdr2/Abcb4*^{-/-}) konnte *norUDCA* der sklerosierenden Cholangitis wirksam entgegenwirken, während UDCA die Zahl an Galleinfarkten durch biliäre Obstruktion sogar steigerte (110). *norUDCA* weist anticholestatische und antiapoptotische Eigenschaften auf (111). Eine kombinierte Therapie bei biliären Erkrankungen (mit hepatozytärer als auch cholangiozellulärer Genese) mit *norUDCA* und UDCA anstelle einer Monotherapie mit *norUDCA* oder UDCA könnte sich vorteilhaft auf den Verlauf dieser Erkrankungen auswirken (111). Kürzlich wurde in molekulardynamischen Simulationen des $\alpha_5\beta_1$ -Integrines gezeigt, dass *norUDCA* zu einer direkten Aktivierung des $\alpha_5\beta_1$ -Integrines führt, die Effektivität der Aktivierung dabei jedoch geringer ausgeprägt ist als durch die Gallensäure TUDC (112). Die Gallensäure *norUDCA* führt dabei zu Konformationsänderungen der Ektodomäne des $\alpha_5\beta_1$ -Integrines mit einer Zunahme des Winkels der Knickstelle der $\alpha 1$ -Helix sowie einer Zunahme des Neigungswinkels der $\alpha 7$ -Helix im Vergleich zu der Kontrollstimulation mit der Gallensäure Taurocholsäure (112). Der Abstand zwischen dem β -Propeller und der βA -Domäne hingegen verringert sich weniger stark im Vergleich zu der Konformationsänderung durch TUDC (112). Weiter zeigt sich in der perfundierten Rattenleber nach Stimulation mit *norUDCA* eine Aktivierung des β_1 -Integrines im intrazellulären Kompartiment der Leberzelle (112). Die dabei gemessene Fluoreszenzintensität des β_1 -Integrines ist jedoch geringer ausgeprägt als die Fluoreszenzintensität, die nach Stimulation mit TUDC nach 5 min und auch 15 min gemessen wurde (112).

Weiter finden Gallensäurederivate wie die Obeticholsäure (OCA) Verwendung in der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen (113). Bei der OCA handelt es sich um einen FXR-Agonisten. In einer aktuellen Studie wurde OCA zu der Therapie von Patienten mit PBC eingesetzt, die nur wenig bis gar nicht auf die Therapie mit UDCA angesprochen

haben (113). Unter Therapie der PBC mit OCA sank bei 70% der Patienten die Konzentration der alkalischen Phosphatase im Serum um 20% (113). Ebenso nahmen die Konzentrationen der Gamma-Glutamyltransferase, des CRP und des IgM ab (113). Als unerwünschte Wirkung scheint OCA bei den Patienten Pruritus auszulösen (113).

Die Leber gehört zu den Geweben, die reich an Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) sind. In der Leber ist insbesondere der Subtyp PPAR α exprimiert. Die PPAR wirken als Transkriptionsfaktoren und regulieren die Expression einer Vielzahl von Genen (114). PPAR-Agonisten, wie etwa die Wirkstoffklasse der Fibrate, finden Einsatz in der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen (115). Hierzu sei erwähnt, dass PPAR-Agonisten die Insertion des humanen Gallensalztransporters *Multidrug-Resistance-Protein 3* (MDR3) in die kanalikuläre Membran der Hepatozyten steigern (115). Der Einbau des Transporters führt zu einer gesteigerten Sekretion von Phosphatidylcholin und wirkt somit zytoprotektiv auf Cholangiozyten hinsichtlich der Toxizität von Gallensäuren (115). Fibrate finden in Studien Einsatz bei UDCA-refraktären Verläufen der PBC (116). In den meisten dieser Studien führt die Therapie mit einem Fibrat zu einer Abnahme der Serumkonzentration der alkalischen Phosphatase (116).

Eine Meta-Analyse, in der die Therapie mit UDCA plus Bezafibrat versus UDCA in Monotherapie zur Behandlung von Patienten mit PBC verglichen wurde, zeigte für die Kombinationstherapie bessere Serummarker (117). Bezüglich der Krankheitssymptomatik und der Überlebenszeit ließ sich jedoch kein Unterschied feststellen (117).

Zurzeit befinden sich PPAR-Agonisten in der Entwicklung, die im Vergleich zu Fibraten einen wesentlich stärkeren anti-inflammatorischen Effekt aufweisen (114).

Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) wirkt sich regulierend auf die Expression von Genen aus, die an der Detoxifikation und Metabolisierung von Gallensäuren und anderen Toxinen beteiligt sind (118). Ein potenter Aktivator des humanen PX-Rezeptors ist das Antibiotikum Rifampicin (119). Es wird zu der Therapie des Pruritus bei Cholestase-Patienten eingesetzt und zudem konnte in einer Studie gezeigt werden, dass es die Cholestaseparameter im Serum bei Patienten mit PBC senkt (119, 120).

Weiter wurde in zwei randomisierten Studien die Kombination aus dem Glukokortikoidrezeptor-Agonisten Budesonid (6-9mg/Tag) zusammen mit UDCA gegenüber der alleinigen Therapie mit UDCA bei Patienten mit PBC im Stadium I-III verglichen. Die Kombinationstherapie lieferte sowohl hinsichtlich der Leberenzyme im Serum als auch der Leberhistologie bessere Ergebnisse als die alleinige Therapie mit UDCA (121, 122).

Einen neuen Ansatz zu der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen liefern Inhibitoren des apikalen Natrium-abhängigen Gallensäuretransporters (ASBT). Der ASBT befindet sich an der luminalen Seite ilealer Enterozyten und transportiert konjugierte Gallensäuren aus dem Darmlumen in die Enterozyten (123). Die Inhibition dieser Transporter unterbricht den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren und vermag den zirkulierenden Pool an Gallensäuren somit zu vermindern (5). Als direkte Konsequenz hieraus kommt es zu einer gesteigerten Synthese von Gallensäuren, was die Abnahme des Serum-Cholesterols bedingt (5). Ob sich jedoch ASBT-Inhibitoren im klinischen Alltag durchsetzen können, werden künftige Studien zeigen müssen (5).

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der enterohepatische Kreislauf.	2
Abb. 2: Klinische Einteilung der Cholestase.....	3
Abb. 3: Hepatobiliäre Transportproteine.	5
Abb. 4: Densitometrische Analyse und Quantifizierung der Immunfluoreszenz von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran.....	19
Abb. 5: Densitometrische Analyse und Quantifizierung der Immunfluoreszenz von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran.	19
Abb. 6: Graphische Veranschaulichung der Entstehung und des Verlaufes der Fluoreszenzprofile von Bsep und ZO-1.	20
Abb. 7: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na⁺/K⁺-ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach der Perfusion mit GCDC-freiem oder GCDC-haltigem normoosmotischen Medium.....	23
Abb. 8: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase nach der Perfusion mit GCDC-freiem oder GCDC-haltigem normoosmotischen Medium zum Zeitpunkt 90 min.	24
Abb. 9: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase nach der Perfusion mit GCDC-freiem normoosmotischen Medium zu den Zeitpunkten 0 min und 90 min und mit GCDC-haltigem normoosmotischen Medium zu den Zeitpunkten 60 min und 90 min.	25
Abb. 10: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na⁺/K⁺-ATPase (grün) nach der Perfusion mit GCDC und der Perfusion mit GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.	27
Abb. 11: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit GCDC und der Perfusion mit GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.	28
Abb. 12: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na⁺/K⁺-ATPase (grün) nach der Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC sowie der Perfusion mit GRGDSP + GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.....	30
Abb. 13: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase nach der Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC sowie der Perfusion mit GRGDSP + GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.....	31

- Abb. 14: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit GRADSP sowie der Perfusion mit GRADSP + GCDC zum Zeitpunkt 90 min...33**
- Abb. 15: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit GRGDSP sowie der Perfusion mit GRGDSP + GCDC zum Zeitpunkt 90 min. .34**
- Abb. 16: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Hepatozyten nach der Perfusion mit H89 sowie der Perfusion mit H89 + GCDC + TUDC zum Zeitpunkt 90 min.36**
- Abb. 17: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Bsep (rot) und ZO-1 (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit normoosmolarem Medium (305 mosmol/l) oder aber der Perfusion mit GCDC.38**
- Abb. 18: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Stimulation mit normoosmolarem Medium (305 mosmol/l) oder aber der hydrophoben Gallensäure GCDC.39**
- Abb. 19: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Bsep (rot) und ZO-1 (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit GCDC oder aber der Perfusion mit GCDC + TUDC.....41**
- Abb. 20: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GCDC oder GCDC + TUDC.....42**
- Abb. 21: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Bsep (rot) und ZO-1 (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC und GRGDSP + GCDC + TUDC.....44**
- Abb. 22: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GRADSP + GCDC + TUDC oder GRGDSP + GCDC + TUDC.45**
- Abb. 23: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GRADSP oder GRADSP + GCDC.47**
- Abb. 24: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Bsep und ZO-1 an der kanalikulären Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GRGDSP oder GRGDSP + GCDC.48**

Abb. 25: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der kanalikulären Breite.....	49
Abb. 26: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und Na⁺/K⁺-ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit normoosmolarem Medium.	51
Abb. 27: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und Na⁺/K⁺-ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Stimulation mit hyperosmolarem Medium.....	52
Abb. 28: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit normoosmolarem und hyperosmolarem Medium.....	53
Abb. 29: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit hyperosmolarem Medium und hyperosmolarem Medium und TUDC.....	55
Abb. 30: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ntcp (rot) und der Na⁺/K⁺-ATPase (grün) in der perfundierten Rattenleber nach Perfusion mit GRADSP + 385 mosmol/l + TUDC und GRGDSP + 385 mosmol/l + TUDC.	57
Abb. 31: Densitometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung von Ntcp und der Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Membran von Rattenhepatozyten nach Perfusion mit GRADSP + 385 mosmol/l + TUDC und GRGDSP + 385 mosmol/l + TUDC.....	58

6 Literaturverzeichnis

1. Hylemon, P. B., Zhou, H., Pandak, W. M., Ren, S., Gil, G., and Dent, P. (2009) Bile acids as regulatory molecules. *Journal Of Lipid Research* **50**, 1509–1520
2. Häussinger, D. (1996) The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochemical Journal* **313**, 593–595
3. Dranoff, J. A., McClure, M., Burgstahler, A. D., Denson, L. A., Crawford, A. R., Crawford, J. M., Karpen, S. J., and Nathanson, M. H. (1999) Short-term regulation of bile acid uptake by microfilament-dependent translocation of rat ntcp to the plasma membrane. *Hepatology* **30**, 223–229
4. Cantore, M., Reinehr, R., Sommerfeld, A., Becker, M., and Häussinger, D. (2011) The Src family kinase Fyn mediates hyperosmolarity-induced Mrp2 and Bsep retrieval from canalicular membrane. *The Journal of biological chemistry* **286**, 45014–45029
5. Beuers, U., Trauner, M., Jansen, P., and Poupon, R. (2015) New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *Hepatology* **62**, S25-37
6. Dombrowski, F., Stieger, B., and Beuers, U. (2006) Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Laboratory investigation* **86**, 166–174
7. Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G. A., Keppler, D., Paumgartner, G., and Dombrowski, F. (2001) Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* **33**, 1206–1216
8. Kurz, A. K., Graf, D., Schmitt, M., Vom Dahl, S., and Häussinger, D. (2001) Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* **121**, 407–419
9. Volpes, R., van den Oord, J J, and Desmet, V. J. (1993) Integrins as differential cell lineage markers of primary liver tumors. *The American journal of pathology* **142**, 1483–1492
10. Gohlke, H., Schmitz, B., Sommerfeld, A., Reinehr, R., and Häussinger, D. (2013) alpha5 beta1-integrins are sensors for tauroursodeoxycholic acid in hepatocytes. *Hepatology* **57**, 1117–1129

11. Häussinger, D., Reinehr, R. (2011) Osmotic Regulation of Bile Acid Transport, Apoptosis and Proliferation in Rat Liver. *Cellular Physiology and Biochemistry* **28**, 1089–1098
12. Sommerfeld, A., Mayer, P. G. K., Cantore, M., and Häussinger, D. (2015) Regulation of plasma membrane localization of the Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) by hyperosmolarity and tauroursodeoxycholate. *The Journal of biological chemistry* **290**, 24237–24254
13. Boyer, J. L. (2013) Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology* **3**, 1035–1078
14. Ballatori, N., Truong, A. T. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *J Physiol* **1992**, G617-624
15. Russell, D. W. (2009) Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *Journal Of Lipid Research* **50 Suppl**, S120-125
16. Lan, K., Su, M., Xie, G., Ferslew, B. C., Brouwer, K. L. R., Rajani, C., Liu, C., and Jia, W. (2016) Key Role for the 12-Hydroxy Group in the Negative Ion Fragmentation of Unconjugated C24 Bile Acids. *Analytical chemistry* **88**, 7041–7048
17. Hofmann, A. F. (2009) The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Frontiers in Bioscience*, 2584-2598
18. Beuers, U. (2006) Drug insight: Mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis. *Nature clinical practice. Gastroenterology & Hepatology* **3**, 318–328
19. Hofmann, A. F. (2009) Pharmacology of Ursodeoxycholic Acid, an Enterohepatic Drug. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **29**, 1–15
20. Parés, A., Caballería, L., Rodés, J., Bruguera, M., Rodrigo, L., García-Plaza, A., Berenguer, J., Rodríguez-Martínez, D., Mercader, J., and Velicia, R. (2000) Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. *Hepatology* **32**, 561–566
21. Poupon, R. E., Lindor, K. D., Parés, A., Chazouillères, O., Poupon, R., and Heathcote, E.J. (2003) Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **39**, 12–16
22. Beuers, U., Spengler, U., Kruis, W., Aydemir, U., Wiebecke, B., Heldwein, W., Weinzierl, M., Pape, G.R., Sauerbruch, T., and Paumgartner, G. (1992) Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: A placebo-controlled trial. *Hepatology* **16**, 707–714

23. Lindor, K. D., Gershwin, M. E., Poupon, R., Kaplan, M., Bergasa, N. V., and Heathcote, E. J. (2009) Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **50**, 291–308
24. Kuiper, Edith M. M., Hansen, B. E., de Vries, Richard A, den Ouden-Muller, Jannie W., van Ditzhuijsen, Theo J. M., Haagsma, E. B., Houben, Martin H. M. G., Witteman, Ben J. M., van Erpecum, Karel J., and van Buuren, Henk R. (2009) Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* **136**, 1281–1287
25. Poropat, G., Giljaca, V., Stimac, D., and Gluud, C. (2011) Bile acids for primary sclerosing cholangitis. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD003626.
26. Stieger, B., Hagenbuch, B., Landmann, L., Höchli, M., Schröder, A., and Meier, P. J. In situ localization of the hepatic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* **1994**, 1781–1787
27. Kubitz, R., Dröge, C., Stindt, J., Weissenberger, K., and Häussinger, D. (2012) The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* **36**, 536–553
28. Claro da Silva, Tatiana, Polli, J. E., and Swaan, P. W. (2013) The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport. *Molecular aspects of medicine* **34**, 252–269
29. Stross, C., Kluge, S., Weissenberger, K., Winands, E., Häussinger, D., and Kubitz, R. (2013) A dileucine motif is involved in plasma membrane expression and endocytosis of rat sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp). *American journal of physiology*. **305**, G722-30
30. Anwer, M. S., and Stieger, B. (2014) Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *European journal of physiology* **466**, 77–89
31. Craddock, A. L., Love, M. W., Daniel, R. W., Kirby, L. C., Walters, H. C., Wong, M. H., and Dawson, P. A. (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *The American journal of physiology* **274**, G157-169
32. Stieger, B. (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. *Handbook of experimental pharmacology*, 205–259
33. Faber, K. N., Müller, M., and Jansen, Peter L M (2003) Drug transport proteins in the liver. *Advanced drug delivery reviews* **55**, 107–124

34. Yanni, S. B., Augustijns, P. F., Benjamin, Daniel K Jr, Brouwer, Kim L R, Thakker, D. R., and Annaert, P. P. (2010) In vitro investigation of the hepatobiliary disposition mechanisms of the antifungal agent micafungin in humans and rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **38**, 1848–1856
35. Ho, R. H., Tirona, R. G., Leake, B. F., Glaeser, H., Lee, W., Lemke, C. J., Wang, Y., and Kim, R. B. (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* **130**, 1793–1806
36. Keitel, V., Burdelski, M., Warskulat, U., Kuhlkamp, T., Keppler, D., Häussinger, D., and Kubitz, R. (2005) Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* **41**, 1160–1172
37. Zollner, G., Fickert, P., Zenz, R., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Kenner, L., Ferenci, P., Stauber, R. E., Krejs, G. J., Denk, H., Zatloukal, K., and Trauner, M. (2001) Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* **33**, 633–646
38. Zollner, G., Fickert, P., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Marschall, H. U., Zatloukal, K., Denk, H., and Trauner, M. (2003) Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *Journal of hepatology* **38**, 717–727
39. Nakai, K., Tanaka, H., Hanada, K., Ogata, H., Suzuki, F., Kumada, H., Miyajima, A., Ishida, S., Sunouchi, M., Habano, W., Kamikawa, Y., Kubota, K., Kita, J., Ozawa, S., and Ohno, Y. (2008) Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **36**, 1786–1793
40. Chen, H.-L., Liu, Y.-J., Chen, H.-L., Wu, S.-H., Ni, Y.-H., Ho, M.-C., Lai, H.-S., Hsu, W.-M., Hsu, H.-Y., Tseng, H.-C., Jeng, Y.-M., and Chang, M.-H. (2008) Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia. *Pediatric research* **63**, 667–673
41. Bechmann, L. P., Kocabayoglu, P., Sowa, J.-P., Sydor, S., Best, J., Schlattjan, M., Beilfuss, A., Schmitt, J., Hannivoort, R. A., Kilicarslan, A., Rust, C., Berr, F., Tschopp, O., Gerken, G., Friedman, S. L., Geier, A., and Canbay, A. (2013) Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **57**, 1394–1406

42. Takeyama, Y., Kanegae, K., Inomata, S., Takata, K., Tanaka, T., Ueda, S.-I., Yokoyama, K., Morihara, D., Nishizawa, S., Anan, A., Irie, M., Iwata, K., Shakado, S., Sohda, T., and Sakisaka, S. (2010) Sustained upregulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and bile salt export pump and downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver of patients with end-stage primary biliary cirrhosis. *Medical molecular morphology* **43**, 134–138
43. Park, S. W., Schonhoff, C. M., Webster, Cynthia R L, and Anwer, M. S. (2012) Protein kinase Cdelta differentially regulates cAMP-dependent translocation of NTCP and MRP2 to the plasma membrane. *American journal of physiology* **303**, G657-65
44. Mukhopadhyay, S., Ananthanarayanan, M., Stieger, B., Meier, P. J., Suchy, F. J., and Anwer, M. S. (1997) cAMP increases liver Na⁺-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *American journal of physiology* **273**, G842-8
45. Webster, C. R., Blanch, C. J., Phillips, J., and Anwer, M. S. (2000) Cell swelling-induced translocation of rat liver Na⁽⁺⁾/taurocholate cotransport polypeptide is mediated via the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* **275**, 29754–29760
46. Webster, Cynthia R L, Srinivasulu, U., Ananthanarayanan, M., Suchy, F. J., and Anwer, M. S. (2002) Protein kinase B/Akt mediates cAMP- and cell swelling-stimulated Na⁺/taurocholate cotransport and Ntcp translocation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 28578–28583
47. McConkey, M., Gillin, H., Webster, Cynthia R L, and Anwer, M. S. (2004) Cross-talk between protein kinases Czeta and B in cyclic AMP-mediated sodium taurocholate cotransporting polypeptide translocation in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **279**, 20882–20888
48. Sarkar, S., Bananis, E., Nath, S., Anwer, M. S., Wolkoff, A. W., and Murray, J. W. (2006) PKCzeta is required for microtubule-based motility of vesicles containing the ntcp transporter. *Traffic* **7**, 1078–1091
49. Mukhopadhyay, S., Ananthanarayanan, M., Stieger, B., Meier, P. J., Suchy, F. J., and Anwer, M. S. (1998) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a serine, threonine phosphoprotein and is dephosphorylated by cyclic adenosine monophosphate. *Hepatology* **28**, 1629–1636

50. Anwer, M. S., Gillin, H., Mukhopadhyay, S., Balasubramaniyan, N., Suchy, F. J., and Ananthanarayanan, M. (2005) Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. *The Journal of biological chemistry* **280**, 33687–33692
51. Grune, S., Engelking, L. R., and Anwer, M. S. (1993) Role of intracellular calcium and protein kinases in the activation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport by cyclic AMP. *The Journal of biological chemistry* **268**, 17734–17741
52. Klee, C. B., Ren, H., and Wang, X. (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *The Journal of biological chemistry* **273**, 13367–13370
53. Webster, Cynthia R L, Blanch, C., and Anwer, M. S. (2002) Role of PP2B in cAMP-induced dephosphorylation and translocation of NTCP. *American journal of physiology* **283**, G44-50
54. Mühlfeld, S., Domanova, O., Berlage, T., Stross, C., Helmer, A., Keitel, V., Häussinger, D., and Kubitz, R. (2012) Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver. *Hepatology* **56**, 2387–2397
55. Stross, C., Helmer, A., Weissenberger, K., Görg, B., Keitel, V., Häussinger, D., and Kubitz, R. (2010) Protein kinase C induces endocytosis of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *American journal of physiology* **299**, G320-8
56. Schonhoff, C. M., Ramasamy, U., and Anwer, M. S. (2011) Nitric oxide-mediated inhibition of taurocholate uptake involves S-nitrosylation of NTCP. *American journal of physiology* **300**, G364-70
57. Zahner, D., Eckhardt, U., and Petzinger, E. (2003) Transport of taurocholate by mutants of negatively charged amino acids, cysteines, and threonines of the rat liver sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide Ntcp. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**, 1117–1127
58. Ramasamy, U., Anwer, M. S., and Schonhoff, C. M. (2013) Cysteine 96 of Ntcp is responsible for NO-mediated inhibition of taurocholate uptake. *American journal of physiology*. **305**, G513-9
59. Geier, A., Fickert, P., and Trauner, M. (2006) Mechanisms of disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis. *Gastroenterology & Hepatology* **3**, 574–585
60. Gonzalez, R., Cruz, A., Ferrin, G., Lopez-Cillero, P., Fernandez-Rodriguez, R., Briceno, J., Gomez, M. A., Rufian, S., Mata, Manuel De la, Martinez-Ruiz, A., Marin, Jose J G, and Muntane, J. (2011) Nitric oxide mimics transcriptional and post-

- translational regulation during alpha-tocopherol cytoprotection against glycochenodeoxycholate-induced cell death in hepatocytes. *Journal of Hepatology* **55**, 133–144
61. Hirano, M., Maeda, K., Hayashi, H., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2005) Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **314**, 876–882
 62. Anwer, M. S. (2004) Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *Hepatology* **39**, 581–590
 63. Kubitz, R., Sütfels, G., Kühlkamp, T., Kölling, R., and Häussinger, D. (2004) Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* **126**, 541–553
 64. Häussinger, D., Schmitt, M., Weiergräber, O., and Kubitz, R. (2000) Short-term regulation of canalicular transport. *Seminars in Liver Disease* **20**, 307–321
 65. Kubitz, R., Häussinger, D. (2007) Osmoregulation of bile formation. *Methods in Enzymology* **428**, 313–324
 66. Schmitt, M., Kubitz, R., Lizun, S., Wettstein, M., and Häussinger, D. (2001) Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* **33**, 509–518
 67. Dombrowski, F., Kubitz, R., Chittattu, A., Wettstein, M., Saha, N., Häussinger, D. (2000) Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochemical Journal* **348**, 183–188
 68. Warsukat, U., Kubitz, R., Wettstein, M., Stieger, B., Meier, P. J., Häussinger, D. (1999) Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. *Biological Chemistry* **380**, 1273–1279
 69. Häussinger, D., Kurz, A. K., Wettstein, M., Graf, D., Vom Dahl, S., and Schliess, F. (2003) Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* **124**, 1476–1487
 70. Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687
 71. Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* **285**, 1028–1032
 72. Hughes, P. E., and Pfaff, M. (1998) Integrin affinity modulation. *Trends in cell biology* **8**, 359–364

73. Krauss, G. (2000) *Biochemistry of signal transduction and regulation*, 2nd Ed., Wiley-VCH, Weinheim, New York
74. Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., and Juliano, R. L. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological reviews* **50**, 197–263
75. Häussinger, D., Kurz, A. K., Wettstein, M., Graf, D., Vom Dahl, S., and Schliess, F. (2003) Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* **124**, 1476–1487
76. Dickinson, C. D., Veerapandian, B., Dai, X. P., Hamlin, R. C., Xuong, N. H., Ruoslahti, E., and Ely, K. R. (1994) Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *Journal of molecular biology* **236**, 1079–1092
77. Akiyama, S. K., Yamada, S. S., Chen, W. T., and Yamada, K. M. (1989) Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *The Journal of cell biology* **109**, 863–875
78. Schliess, F., Reissmann, R., Reinehr, R., Vom Dahl, S., and Häussinger, D. (2004) Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *The Journal of biological chemistry* **279**, 21294–21301
79. Sies, H. (1978) The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems. *Methods in Enzymology* **52**, 48–59
80. Sommerfeld, A., Reinehr, R., and Häussinger, D. (2015) Tauroursodeoxycholate Protects Rat Hepatocytes from Bile Acid-Induced Apoptosis via β 1-Integrin- and Protein Kinase A-Dependent Mechanisms. *Cellular physiology and biochemistry* **36**, 866–883
81. Kubitz, R., Warskulat, U., Schmitt, M., and Häussinger, D. (1999) Dexamethasone- and osmolarity-dependent expression of the multidrug-resistance protein 2 in cultured rat hepatocytes. *The Biochemical journal* **340**, 585–591
82. Dawson, P. A., Lan, T., and Rao, A. (2009) Bile acid transporters. *Journal Of Lipid Research* **50**, 2340–2357
83. Trauner, M., and Boyer, J. L. (2003) Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiological reviews* **83**, 633–671

84. Mayer, P. G. K., Qvarthkhava, N., Sommerfeld, A., Görg, B., and Häussinger, D. (2019) Regulation of Plasma Membrane Localization of the Na⁺-Taurocholate Co-Transporting Polypeptide by Glycochenodeoxycholate and Tauroursodeoxycholate. *Cellular physiology and biochemistry* **52**, 1427–1445
85. Becker, S., Reinehr, R., Graf, D., Vom Dahl, S., and Häussinger, D. (2007) Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation. *Cellular physiology and biochemistry* **19**, 89–98
86. Gartung, C., Ananthanarayanan, M., Rahman, M. A., Schuele, S., Nundy, S., Soroka, C. J., Stolz, A., Suchy, F. J., and Boyer, J. L. (1996) Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **110**, 199–209
87. Haselow, K., Bode, J. G., Wammers, M., Ehling, C., Keitel, V., Kleinebrecht, L., Schupp, A.-K., Häussinger, D., and Graf, D. (2013) Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages. *Journal of leukocyte biology* **94**, 1253–1264
88. Vom Dahl, S., Schliess, F., Reissmann, R., Görg, B., Weiergräber, O., Kocalkova, M., Dombrowski, F., and Häussinger, D. (2003) Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *The Journal of biological chemistry* **278**, 27088–27095
89. Reinehr, R., Gohlke, H., Sommerfeld, A., Vom Dahl, S., and Häussinger, D. (2010) Activation of integrins by urea in perfused rat liver. *The Journal of biological chemistry* **285**, 29348–29356
90. Rodrigues, C. M., Fan, G., Wong, P. Y., Kren, B. T., and Steer, C. J. (1998) Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Molecular medicine* **4**, 165–178
91. Roelofsen, H., Soroka, C. J., Keppler, D., and Boyer, J. L. (1998) Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *Journal of cell science* **111**, 1137–1145
92. Misra, S., Varticovski, L., and Arias, I. M. (2003) Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *American journal of physiology*. **285**, G316-24

93. Kubitz, R., D'urso, D., Keppler, D., and Häussinger, D. (1997) Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* **113**, 1438–1442
94. Huang, C., Ni, Y., Wang, T., Gao, Y., Haudenschild, C. C., and Zhan, X. (1997) Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **272**, 13911–13915
95. Layden, T. J., Schwarz, and Boyer, J. L. (1975) Scanning electron microscopy of the rat liver. Studies of the effect of tauroolithocholate and other models of cholestasis. *Gastroenterology* **69**, 724–738
96. Miyai, K., Richardson, A. L., Mayr, W., and Javitt, N. B. (1977) Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts. 1. Effects of lithocholic, 3beta-hydroxy-5-cholenoic, cholic, and dehydrocholic acids. *Laboratory investigation* **36**, 249–258
97. Jung, W., Gebhardt, R., and Robenek, H. (1982) Primary cultures of rat hepatocytes as a model system of canalicular development, biliary secretion, and intrahepatic cholestasis. II. Tauroolithocholate-induced alterations of canalicular morphology and of the distribution of filipin-cholesterol complexes. *European journal of cell biology* **29**, 77–82
98. Abernathy, C. O., Zimmerman, H. J., Ishak, K. G., Utili, R., and Gillespie, J. (1992) Drug-induced cholestasis in the perfused rat liver and its reversal by tauroursodeoxycholate: An ultrastructural study. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **199**, 54–58
99. Baiocchi, L., Tisone, G., Russo, M. A., Longhi, C., Palmieri, G., Volpe, A., Almerighi, C., Telesca, C., Carbone, M., Toti, L., Leonardis, F. de, and Angelico, M. (2008) TUDCA prevents cholestasis and canalicular damage induced by ischemia-reperfusion injury in the rat, modulating PKCalpha-ezrin pathway. *Transplant international* **21**, 792–800
100. Schölmerich, J., Kitamura, S., Baumgartner, U., Miyai, K., and Gerok, W. (1990) Taurohyocholate, taurocholate, and tauroursodeoxycholate but not tauroursocholate and taurodehydrocholate counteract effects of tauroolithocholate in rat liver. *Research in experimental medicine* **190**, 121–129
101. Kurz, A. K., Block, C., Graf, D., Dahl, S. V., Schliess, F., and Häussinger, D. (2000) Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. *The Biochemical journal* **350**, 207–213

102. Cosen-Binker, L. I., and Kapus, A. (2006) Cortactin: The gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology* **21**, 352–361
103. Ingber, D. E. (1997) Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual review of physiology* **59**, 575–599
104. Häussinger, D., Hallbrucker, C., Saha, N., Lang, F., and Gerok, W. (1992) Cell volume and bile acid excretion. *The Biochemical journal* **288**, 681–689
105. Häussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lang, F., and Gerok, W. (1993) Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *The Biochemical journal* **291**, 355–360
106. Lindor, K. D., Kowdley, K. V., Luketic, Velimir A C, Harrison, M. E., McCashland, T., Befeler, A. S., Harnois, D., Jorgensen, R., Petz, J., Keach, J., Mooney, J., Sargeant, C., Braaten, J., Bernard, T., King, D., Miceli, E., Schmoll, J., Hoskin, T., Thapa, P., and Enders, F. (2009) High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **50**, 808–814
107. Marschall, H.—U., Wagner, M., Zollner, G., Fickert, P., Diczfalusy, U., Gumhold, J., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Benthin, L., Grundström, R., Gustafsson, U., Sahlin, S., Einarsson, C., and Trauner, M. (2005) Complementary Stimulation of Hepatobiliary Transport and Detoxification Systems by Rifampicin and Ursodeoxycholic Acid in Humans. *Gastroenterology* **129**, 476–485
108. Beuers, U., Hohenester, S., de Buy Wenniger, Lucas J Maillette, Kremer, A. E., Jansen, Peter L M, and Elferink, Ronald P J Oude (2010) The biliary HCO₃⁽⁻⁾ umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology* **52**, 1489–1496
109. Hofmann, A. F., Zakko, S. F., Lira, M., Clerici, C., Hagey, L. R., Lambert, K. K., Steinbach, J. H., Schteingart, C. D., Olinga, P., and Groothuis, Geny M M (2005) Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans. *Hepatology* **42**, 1391–1398
110. Fickert, P., Pollheimer, M. J., Silbert, D., Moustafa, T., Halilbasic, E., Krones, E., Durchschein, F., Thüringer, A., Zollner, G., Denk, H., and Trauner, M. (2013) Differential effects of norUDCA and UDCA in obstructive cholestasis in mice. *Hepatology* **58**, 1201–1208
111. Denk, G. U., Maitz, S., Wimmer, R., Rust, C., Invernizzi, P., Ferdinandusse, S., Kulik, W., Fuchsbichler, A., Fickert, P., Trauner, M., Hofmann, A. F., and Beuers, U.

- (2010) Conjugation is essential for the anticholestatic effect of NorUrsodeoxycholic acid in tauroolithocholic acid-induced cholestasis in rat liver. *Hepatology* **52**, 1758–1768
112. Bonus, M., Sommerfeld, A., Qvarthava, N., Görg, B., Ludwig, B. S., Kessler, H., Gohlke, H., and Häussinger, D. (2020) Evidence for functional selectivity in TUDC- and norUDCA-induced signal transduction via $\alpha 5\beta 1$ integrin towards cholestasis. *Scientific reports* **10**, 5795
113. Hirschfield, G. M., Mason, A., Luketic, V., Lindor, K., Gordon, S. C., Mayo, M., Kowdley, K. V., Vincent, C., Bodhenheimer, H. C., Parés, A., Trauner, M., Marschall, H.-U., Adorini, L., Sciacca, C., Beecher-Jones, T., Castelloe, E., Böhm, O., and Shapiro, D. (2015) Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* **148**, 751-61.e8
114. Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2015) Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **62**, 720–733
115. Matsumoto, T., Miyazaki, H., Nakahasaki, Y., Hirohara, J., Seki, T., Inoue, K., Okazaki, K. (2004) Multidrug resistance3 is in situ detected in the liver of patients with primary biliary cirrhosis, and induced in human hepatoma cells by bezafibrate. *Hepatology research* **30**, 125–136
116. Cuperus, Frans J C, Halilbasic, E., and Trauner, M. (2014) Fibrate treatment for primary biliary cirrhosis. *Current opinion in gastroenterology* **30**, 279–286
117. Zhang, Y., Chen, K., Dai, W., Xia, Y., Wang, F., Shen, M., Cheng, P., Wang, C., Yang, J., Zhu, R., Zhang, H., Li, J., Zheng, Y., Wang, J., Lu, J., Zhou, Y., and Guo, C. (2015) Combination therapy of bezafibrate and ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Hepatology research* **45**, 48–58
118. Kliewer, S. A., and Willson, T. M. (2002) Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor. *Journal Of Lipid Research* **43**, 359–364
119. Bachs, L., Parés, A., Elena, M., Piera, C., and Rodés, J. (1989) Comparison of rifampicin with phenobarbitone for treatment of pruritus in biliary cirrhosis. *Lancet* **1**, 574–576
120. Bachs, L., Parés, A., Elena, M., Piera, C., and Rodés, J. (1992) Effects of long-term rifampicin administration in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **102**, 2077–2080

121. Leuschner, M., Maier, K.-P., Schlichting, J., Strahl, S., Herrmann, G., Dahm, H. H., Ackermann, H., Happ, J., and Leuschner, U. (1999) Oral budesonide and ursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis: Results of a prospective double-blind trial. *Gastroenterology* **117**, 918–925
122. Rautiainen, H., Kärkkäinen, P., Karvonen, A.-L., Nurmi, H., Pikkarainen, P., Nuutinen, H., and Färkkilä, M. (2005) Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: a three-year randomized trial. *Hepatology* **41**, 747–752
123. Hagenbuch, B., and Dawson, P. (2004) The sodium bile salt cotransport family SLC10. *European journal of physiology* **447**, 566–570

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Häussinger für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf anfertigen zu können und für die Bereitstellung des interessanten Themas der vorliegenden Arbeit. Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Häussinger für die Unterstützung und die Anregungen in den gemeinsamen Gesprächen danken, die in besonderem Maße dazu beigetragen haben, dass Ergebnisse erarbeitet wurden, die publiziert werden konnten. Auch für die Möglichkeit an insgesamt zwei Publikationen zu partizipieren bedanke ich mich herzlich.

Weiter gilt mein Dank Frau Dr. Sommerfeld, die den Beginn meiner Arbeit im Labor unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Görg, der die Betreuung meiner Arbeit in einem besonders schweren Stadium übernommen hat. Ich möchte mich für die zahlreichen persönlichen Telefonate und Gespräche bedanken, die immerzu konstruktiv waren und den Fortgang der vorliegenden Arbeit maßgeblich beeinflusst haben.

Auch möchte ich Frau Eichhorst für die Anfertigung der Leberperfusionen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Stieger für die Bereitstellung der Antikörper Ntcp und Bsep.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, herzlich danken, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben und mir bis zuletzt Mut gemacht haben, an mich und diese Arbeit zu glauben.