

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger)

**p38 MAP-Kinase abhängiges Targeting von MRP 2-Transportern in
HepG2-Zellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Youssef Benali

2007

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

gez.: Univ.-Prof. Dr.med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Kubitz
Korreferent: Fischer

1.	EINLEITUNG	7
1.1	Aufbau und Funktion der Leberzelle	10
1.2	Aufbau und Funktion von Transportproteinen	12
1.3	Aufbau und Funktion des Zytoskeletts	14
1.4	Lebererkrankungen mit Störungen des hepatobiliären Transports	16
1.5	Aufbau und Funktion von Signalkaskaden am Beispiel der p38 MAP-Kinasen	19
2.	FRAGESTELLUNG	22
3.	MATERIALIEN UND METHODEN	23
3.1	Materialien	23
3.2	Zellkultivierung	24
3.3	Versuchsdurchführung	25
3.3.1	Cycloheximid Konzentrationsreihe	25
3.3.2	Cycloheximid Zeitreihe	26
3.3.3	Cycloheximid und Inhibitoren	26
3.3.4	Cycloheximid und Cytochalasin D	27
3.3.5	Cycloheximid und Colchicin	28
3.3.6	Anisomycin Zeit-Konzentrationsreihe	28
3.3.7	Cycloheximid und PD 098059	28
3.3.8	Cycloheximid und Gö 6850	29
3.4	Zelltransfektion	29
3.5	Immunfluoreszenz	30
3.6	Western-Blot	33

3.7	Datenerhebung	34
3.8	Statistik	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.1	Bildung von Pseudokanalikuli in HepG2-Zellen	36
4.2	Wirkung von Cycloheximid in HepG2-Zellen	38
4.2.1	Zeitverlauf	38
4.2.2	Konzentrationsabhängigkeit	41
4.3	Wirkung von Anisomycin auf HepG2-Zellen	43
4.4	Beeinflussung der Bildung von Pseudokanalikuli durch den Inhibitor SB 202190 der p38 MAP-Kinase und seinem inaktiven Analogon SB 202474	45
4.5	Wirkung des MEK 1-Inhibitors PD 098059 auf die Cycloheximid induzierte Zunahme der MRP2-haltigen Pseudokanalikuli	48
4.6	Wirkung des Proteinkinase C-Inhibitors Gö 6850 auf den Cycloheximid vermittelten Effekt	49
4.7	Effekt von Cycloheximid auf die p38 MAP-Kinase	50
4.8	Transfektion einer konstitutiv aktiven MAP-Kinase-Kinase 6 (MKK6) zur Steigerung der p38 MAP-Kinase Aktivität	52
4.9	Einfluss von Cytochalasin D auf die Bildung der Pseudokanalikuli in HepG2-Zellen	55
4.10	Einfluss des Mikrotubulus-Hemmstoffs Colchicin auf die Ausbildung von Pseudokanalikuli in HepG2-Zellen	58
5.	DISKUSSION	60
5.1	Einfluss von Cycloheximid auf die Lokalisation von MRP2	60
5.2	Signalweg des induzierten Targetings	62

5.3	Einfluss des Zytoskeletts auf das p38 MAP-Kinase abhängige Targeting der MRP2-haltigen Pseudokanalikuli	67
6.	ZUSAMMENFASSUNG	70
7.	LITERATURVERZEICHNIS	70
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	92
9.	ANHANG	94

Abkürzungen

AP	Aktivator-Protein
ASK	Apoptosis signal regulating kinase
ATCC	American Type Culture Collection
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosin-5' -triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BSEP	Bile salt export pump
cAMP	Adenosin-3' ,5' -cyclophosphat
cMOAT	Canalicular multispecific organic anion transporter
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DHC	Dynein heavy chain
DIC	Dynein intermediate chain
DLC	Dynein light chain
DLK	Dual leucine zipper bearing kinase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1, 4-Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extracellular signal regulated kinase
ERM	Ezrin Radixin Moesin
FBS	Fetale bovine serum
GT	Glutaryltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
Hsp	Hitzeschockprotein
JNK	Jun-N-terminal kinase
KHC	Kinesin heavy chain
KLC	Kinesin light chain
MAP	Mitogen-activated protein
MAPKAP	MAP-kinase-activated protein
MDR	Multidrug resistance protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase / Erk-Kinase
MEKK	Mitogen-activated protein kinase/ Erk-Kinase kinase
MKK	MAP-kinase-kinase
MKKK	MAP-kinase kinase-kinase
MKP	MAP-kinase-phosphatase
MLK (SPRK)	Mixed lineage Kinase 3
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug resistance associated protein
Ntcp	Natrium-Taurocholat-Kotransporter
OATP	Organischer Anionentransporter
PAK	p21 activated kinase
PBS	Phosphate buffered saline
PFIC	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase
PI3	Phosphatidylinositol 3-kinase

PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Proteinphosphatase
RSK	Ribosomal S6' kinase
SDS	Natriumdodekylsulfat
TAK	Tripel-MAP-Kinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF receptor associated factor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TUDC	Tauroursodesoxycholol
ZO	Zonula occludin

1. Einleitung

Die kanalikuläre Membran der Leberzellen weist eine Reihe von Transportern auf, die zur *ATP-binding-cassette (ABC) transporter superfamily* gehören (126). Dabei handelt es sich um eine der größten Superfamilien, sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten (3,29). Zurzeit sind 48 ABC-Transporter beim Menschen bekannt. Sie werden je nach Organisation ihrer Domänen und Aminosäuresequenzen in 7 Unterfamilien gegliedert (28). In Bezug auf den Gallenstoffwechsel sind drei Unterfamilien von besonderem Interesse, die ABCB-, die ABCC- und die ABCG-Subfamilie, deren Vertreter spezifische Substrate in die Gallenflüssigkeit sezernieren. Zu der ABCB Subfamilie zählen die *bile salt export pump* BSEP (SPGP/ABCB11), die P-Glykoproteine MDR1 (PGY1/ABCB1) und MDR3 (PGY3/ABCB4). Zur ABCC Subfamilie zählt unter anderem das *multidrug resistance associated protein 2* MRP2 (cMOAT/ABCC2). Innerhalb der ABCG Subfamilie spielt das ABCG5 (White 3) und das ABCG8 eine Rolle beim Lipid- und Gallensäurestoffwechsel; diese beiden Halbtransporter transportieren zusammen Cholesterin in die Galle (48). Die Regulation dieser Proteine sowie die ungestörte Funktion dieser ABC-Transporter ist Voraussetzung für eine intakte Gallensekretion. Mutationen in den ABC-Transportern sind teilweise für schwer verlaufende cholestatische Erkrankungen verantwortlich (72,169).

Die langfristige Regulation dieser Transporter erfolgt auf Ebene der Genexpression (93,178), die kurzfristige dagegen durch kovalente Modifikationen der Transporterproteine (49,131). Störungen der Regulation auf lang- oder kurzfristiger Ebene führt zu insuffizienter Gallensekretion und mündet häufig in Cholestasen (49,83).

Das MRP2 ist für die kanalikuläre Sekretion von Gluthation und konjugierten Glukuroniden, zum Beispiel Bilirubindiglukuronid verantwortlich (60,65,135). Genetisch bedingte Störungen der MRP2 Expression sind Ursache des Dubin-

Johnson Syndroms, welches sich durch eine konjugierte Hyperbilirubinämie mit daraus resultierendem Ikterus auszeichnet (72).

In verschiedenen Zellmodellen wurde nachgewiesen, dass MRP2 zur Resistenzbildung gegen Chemotherapeutika wie Cisplatin und Doxorubicin führen kann (27,173).

Die Regulation des MRP2 ist bis heute vorwiegend in Tiermodellexperimenten der Rattenleber untersucht worden. In dieser konnte bisher gezeigt werden, dass die MRP2 Expression durch Endotoxin, Gallengangsobstruktion, Osmolaritätsänderung, Dexamethason, Schwermetalle oder Medikamente reguliert werden kann (25,31,93,94,137,176).

Innerhalb kurzer Zeit kann MRP2 genauso wie BSEP aus subapikalen Vesikeln in die kanalikuläre Membran eingebaut, wie auch aus der kanalikulären Membran in Vesikel endozytiert werden. Diese Vorgänge können durch Taurocholat, Veränderungen der Isoosmolarität, Endotoxine, Phalloidin, Östrogen aber auch durch oxidativen Stress initiiert werden (31,45,89,94,145,151,152).

Bezüglich der Signalvermittlung konnte durch Experimente in der Rattenleber gezeigt werden, dass die *mitogen-activated-protein-kinases* (MAP-Kinasen), zu welchen die p38, ERK und die JNK gehören, essentiell sind für die Vermittlung des choleretischen Effekts bei Zellschwellung und bei Behandlung mit Tauroursodesoxycholat (TUDC), das bei der Behandlung cholestatischer Zustände eingesetzt wird (102,103,130,150).

Hyperosmolare Zellschwellung und TUDC führen zur Aktivierung der MAP-Kinasen vom ERK-Typ und der p38 MAP-Kinasen, verbunden mit einer Translokation der Gallensäureexportpumpe BSEP aus einem intrazellulären Kompartiment in die Zellmembran. Eine Hemmung der ERK aktivierenden MAP-Kinase-Kinase (MKK) MEK 1 durch PD 098059 (130,150) und der p38 MAP-Kinase durch SB 202190, einem spezifischen Inhibitor der p38 MAP-Kinase, unterbinden den choleretischen Effekt durch TUDC und der Zellschwellung durch eine Hemmung der Translokation von BSEP in die kanalikuläre Membran (103).

Die MAP-Kinasen werden in einer modularen Art und Weise aktiviert. In der Signalkaskade der p38 MAP-Kinase befinden sich MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MKKK), wie TAK1, ASK1, SPRK und PAK, die ihrerseits die MKKs aktivieren. Im

Falle der p38 MAP-Kinase sind das die MKK3 und die MKK6. Diese wiederum aktivieren letztlich die p38 MAP-Kinase (190), welche selbst zur Aktivierung von nukleären Faktoren und nicht-nukleären Faktoren führt. Bei nukleären Faktoren handelt es sich um Proteine, die im Zellkern zur Genaktivierung oder -inaktivierung führen. Zu den p38 MAP-Kinase abhängigen nukleären Faktoren zählen unter anderem ATF2, Elk1, GADD153, MAX und MLK3 (190). Die nicht-nukleären Faktoren dienen der Informationsvermittlung außerhalb des Zellkerns. Zu den p38 MAP-Kinase abhängigen nicht-nukleären Faktoren sind die MAP-Kinase-activated protein kinases (MAPKAP) 2 und 3 zu zählen. Die MAPKAP2 phosphoryliert das *small-heat-shock-protein* hsp27 (167), das am Aktin Metabolismus beteiligt ist (167,190). Mittlerweile ist bekannt, dass mindestens 4 Isoformen der p38 MAP-Kinase existieren (69) (siehe 1.5).

Neben dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) als Aktivator der Proteinkinase A und der p38 MAP-Kinase spielen eine Reihe anderer Kinasen beim Transporter-Targeting eine Rolle. Zu diesen Kinasen gehören die PI3-Kinase (46) und verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) (9,10,11,90,91,143).

1.1 Aufbau und Funktion der Leberzelle

Die Leberzellen oder Hepatozyten gehören zu den funktionell vielseitigsten Zellen des Organismus. Auf Grund des hohen Metabolismus enthalten sie unter anderem viel rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum (ER) und viele Mitochondrien vom Krista-Typ, die durch ihren Enzymreichtum eine wichtige Rolle bei der Energielieferung spielen (siehe Abb. 1). Zur Funktion der Hepatozyten gehört es, Gallensäuren zu bilden. Die Gallenflüssigkeit ist wichtig für die intestinale Verdauung, für die Absorption der Lipide und der fettlöslichen Vitamine A, D, E, K. Weiterhin ist Galle für die Eliminierung von Umweltgiften, Karzinogenen, Toxinen und deren Metabolite notwendig. Sie stellt den Hauptweg für die Exkretion endogener Verbindungen und metabolischer Produkte wie Cholesterin, Bilirubin und Hormonen dar (15, 128). Die Galle wird von den Hepatozyten in Kanalikuli sezerniert, die von den Wänden der Hepatozyten gebildet werden. Die Gallensekretion ist ein osmotischer Prozess, der durch die aktive Sekretion organischer Verbindungen und dem passiven Nachströmen von Wasser, Elektrolyten und anderen Substanzen wie beispielsweise Glucose ermöglicht wird (14,162). Diese vektorielle Exkretion der Gallensalze aus dem Blut in die Galle stellt den Hauptmechanismus des Gallenflusses dar. Die Exkretion von reduziertem Gluthation und Bikarbonat trägt als Gallensäure-unabhängige Fraktion ebenfalls zum Gallenfluss bei (6,13,71). Zu den Hauptbestandteilen der Galle zählen Gallensalze, Phospholipide und Cholesterin, welche zusammen die so genannten 'gemischten Mizellen' in der Galle bilden. Der menschliche Gallensalz-Pool umfasst etwa 50-60 μmol Gallensalz/kg Körpergewicht, das entspricht einer Gesamtmenge von 3-4 g.

In den Gallengängen wird die Galle während des Transports durch sekretorische und absorptive Vorgänge weiter modifiziert. Der Hauptanteil der Galle wird in konzentrierter Form während Fastperioden in der Gallenblase gespeichert (59,98,119). Nach Sekretion der Galle in den Dünndarm werden viele organisch biliäre Verbindungen, besonders aber die Gallensalze, Cholesterin und Phospholipide nach Erreichen des Dünndarms mit hoher Effizienz rückresorbiert. Sie

zirkulieren im enterohepatischen Kreislauf etwa 6-10 Mal täglich, so dass eine Sekretionsleistung für Gallensalze von etwa 20-40 g erreicht wird. Trotz einer hohen Rückresorptionsrate gehen etwa 0.5 g der Gallensalze durch fäkale Exkretion verloren, welche neusynthetisiert werden müssen (59,98,119).

Das vor allem aus dem Hämoglobinabbau stammende Bilirubin wird als primäres Bilirubin, welches an Albumin gekoppelt ist in die Leberzelle aufgenommen und mit Hilfe der Glukuronyltransferase konjugiert und als hydrophiles direktes Bilirubin in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden (160). Es werden etwa 15% im Ileum deglukuroniert, resorbiert und enterhepatisch rezirkuliert. Die übrigen 85% werden mit dem Stuhl ausgeschieden (160).

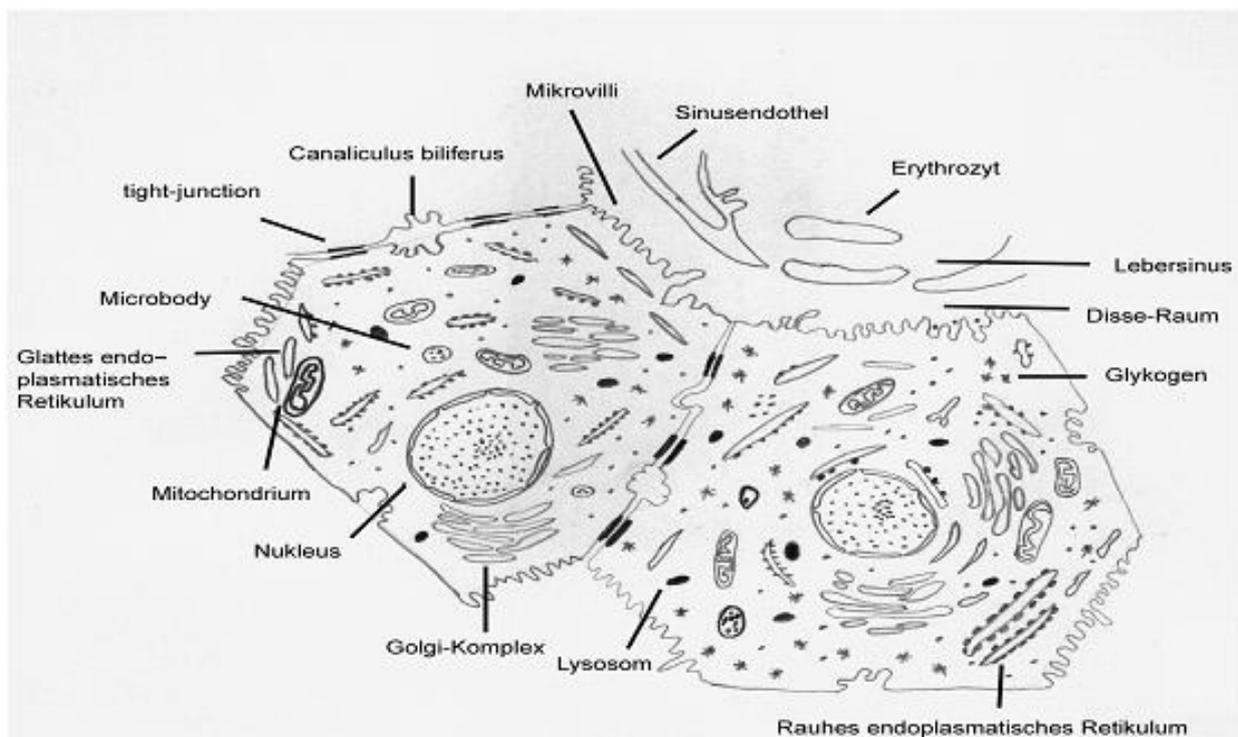


Abb. 1: Schematische Zeichnung einer Leberzelle

Im Sinusbereich ist die Leberzelle mit Mikrovilli ausgestattet, die in den Disse-Raum hineinragen. Abbildung modifiziert nach Schiebler, Schmidt, Zilles. Anatomie. Springer Verlag. 7. Auflage 1997.

1.2 Aufbau und Funktion von Transportproteinen

Lipid-Doppelschichten sind für die meisten polaren Moleküle undurchlässig. Um derartige Moleküle dennoch zu befördern, enthalten die Zellmembranen spezifische Transportproteine, die für den Transport niedermolekularer Stoffe durch die Membran verantwortlich sind. Bei diesen Membran-Transportproteinen handelt es sich um *multipass* Transmembranproteine, deren Polypeptidketten die Lipid-Doppelschichten mehrmals durchdringen. Es gibt zwei Klassen solcher Membran-Transportproteine: *Carrier*-Proteine und Kanal-Proteine (113).

Carrier-Proteine binden bestimmte niedermolekulare Stoffe und befördern sie durch die Doppelschicht, indem sie eine Konformitätsänderung vollziehen und auf diese Weise ihre Molekülbindungsstelle erst auf der einen und anschließend auf der anderen Seite der Membran exponieren (113). Manche *Carrier*-Proteine befördern ihr Substrat nur entsprechend einem Gradienten (passiv); andere durchlaufen, angetrieben von ATP-Hydrolyse oder Ionenbindung (aktiv), eine Reihe von Konformationsänderungen und können so das gebundene Molekül auch gegen dessen elektrochemischen Gradienten transportieren (113). Dabei unterscheidet man Kotransporter von Uniports, bei denen ein Molekül von einer Seite auf die andere Seite transportiert wird. Kotransporter arbeiten als Symport, wenn sie zwei Moleküle in gleicher Richtung transportieren; und als Antiport, wenn sie zwei Moleküle in entgegengesetzter Richtung transportieren.

Kanal-Proteine bilden wassergefüllte Poren, welche die Doppelschicht durchqueren. Sie ermöglichen anorganischen Ionen von geeigneter Größe und Ladung den Membrandurchgang, entsprechend ihrem elektrochemischen Gradienten.

Die Transportgeschwindigkeit von Kanälen liegt dabei mindestens 100 mal höher als die bei den schnellsten *Carrier*-Proteinen. Die Ionenkanäle sind kontrolliert, sie öffnen sich gewöhnlich nur vorübergehend als Reaktion auf ein spezifisches Signal in der Membran. Das kann beispielsweise die Bindung eines Neurotransmitters (transmitterkontrollierte Kanäle) oder eine Veränderung des Membranpotentials (spannungskontrollierte Kanäle) sein (113).

Auch innerhalb der Zellen finden aktive Transportvorgänge statt. Diese werden analog zu den Transportvorgängen an der äußeren Zellmembran auch an der

inneren Membran des Zytosols beobachtet. Außerdem werden in der Zelle Syntheseprodukte in Form von Vesikeln transportiert. Diese Vesikel bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und transportieren Proteine. Die transportierten Proteine sind vorher an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert worden. Dort schnüren sie sich ab und verschmelzen mit den Zisternen des Golgi-Apparats. Im Golgi-Apparat können Modifikationen vorgenommen werden. Wird die Zelle zur Proteinsekretion stimuliert, schnüren sich die Vesikel vom Golgi-Apparat ab und wandern entlang des Zytoskeletts zu ihrem Bestimmungsort.

Ein Beispiel für ein ATP-getriebenes Transportprotein, welches transmembranär angeordnet ist, ist das 1992 entdeckte und zur MRP-Familie gehörende (107) *multidrug resistance associated protein 2* (MRP2) (siehe Abb. 2). Es hat eine molekulare Masse von etwa 200 kDa, der Genort befindet sich auf Chromosom 10q23-24 (85,107,183). Das Gen besteht aus 45 Kilobasen und setzt sich aus 32 Exons mit Größen von 56 bis 255 Basenpaaren zusammen (179). Das MRP2-Transporterprotein besteht beim Menschen aus 1545 Aminosäuren und hat 12-16 transmembranär angeordnete Domänen (88,173,184). MRP2 besitzt die zwei für ABC-Transporter typischen *nucleotide binding folds*.

MRP2 wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, geringe Mengen sind aber auch in Enterozyten (87) und den proximalen Tubuluszellen der Nieren lokalisiert (87). In den Hepatozyten ist es in der apikalen Membran zu finden (87). Das MRP2 transportiert vorwiegend anionische Konjugate, Bilirubinkonjugate, Leukotrien C₄, oxidiertes und reduziertes Gluthation, 17 α -Glucuronosylestradiol (107). Die durch MRP2 transportierten Zytostatika sind Anthrazykline, Vinka-Alkaloide, Methotrexat, Camptothecine und Cisplatin (23,27,107,117).

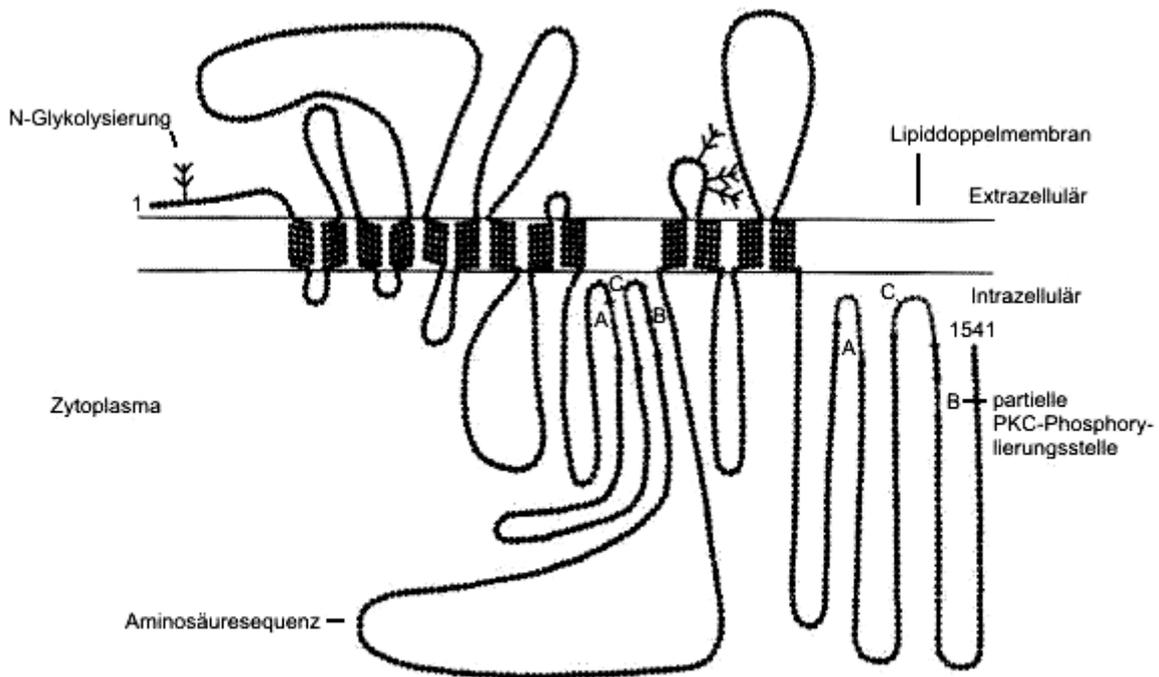


Abb. 2: Schematische Darstellung des MRP2 –Transporters der Ratte mit 1541 Aminosäuren (modifiziert nach Keppler und König (78)).

1.3 Aufbau und Funktion des Zytoskeletts

Die charakteristische Gestalt einer Zelle mit der solartigen Konsistenz des Zytoplasmas und dem beinahe flüssigen Zustand der Plasmamembran (*fluid mosaic*) wird durch ein veränderungsfähiges, dynamisches Verspannungs- und Versteifungssystem, dem Zytoskelett, aufrechterhalten. Es besteht aus Strukturproteinen unterschiedlicher Zusammensetzung. Das Zytoskelett unterstützt und beeinflusst Vorgänge zur Formveränderung der Zelle, Zytoplasmabewegungen und den Transport von Zellorganellen (43,121,168).

Das Zytoskelett hat ein hohes negatives elektrisches Energiepotential, es ist auf Grund seiner Vielzahl von Interaktionen sowohl katalytische Oberfläche als auch Protein-Kofaktor bei zellulären Prozessen (62,171,172). Des Weiteren stellt das Zellgerüst einen Komplex dar, auf dem sich Motor-Proteine wie Kinesin und Dynein fortbewegen (63,157). Diese multimerischen Proteine sind unter anderem an

intrazellulären Transportvorgängen beteiligt (155,156). Kinesin-Proteine bilden eine große Superfamilie von molekularen Motor-Proteinen (157). Das Kinesin ist ein tetrameres Protein. Es besteht aus zwei schweren (KHC 110-130 kDa) und zwei leichten Proteinketten (KLC 65 kDa) (52). Das Kinesin setzt sich aus einer Motor-Domäne, die an den Mikrotubulus bindet und sich unter ATP-Hydrolyse darauf fortbewegt und einer *tail*-Domäne, welche direkt oder über Adapter Komplex Proteine mit der Fracht interagiert, zusammen (57,120,158). Das Dynein Motor-Protein funktioniert über denselben Mechanismus. Dynein ist ein multimeres Protein, das aus zwei schweren (DHC 440-530 kDa), zwei bis drei intermediären (DIC 70-74 kDa) und einer unterschiedlichen Anzahl von leichten Proteinketten (DLC 50-55 kDa) besteht (154,187). Die Motorproteine haben zwei Hauptaufgaben. Einerseits vermitteln sie den Transport von Strukturen wie Vesikel, Organellen (Mitochondrien, Peroxysomen, Lysosomen), Proteinkomplexe und mRNA zu Zielorten entlang der zytoskelettalen Anordnung der Mikrotubuli (53); andererseits sind sie an der Bewegungsorganisation der Chromosomenwanderung während der Zellteilung und an dem mitotischen Spindelapparat beteiligt (58,123,159,182).

Mikrotubuli sind integrale Zellbestandteile, die abgesehen von Erythrozyten in allen menschlichen Zellen vorhanden sind. Dabei handelt es sich um gestreckte Röhrrchen, die eine Länge von bis zu 25 μm und einen Durchmesser von 24 nm erreichen können, ihre lichte Weite kann bis zu 15 nm betragen. Sie liegen einzeln oder in Bündeln vor. Sie bestehen aus globulären Proteinen und Tubulinen. Zwei Untereinheiten, α -Tubulin und β -Tubulin, sind zu einem Dimer verbunden. Dimere fügen sich zu perlschnurartigen Strängen (Tubulinprotofilamenten) zusammen und jeweils 13 bilden die Wand eines Tubulus (53,149).

Mikrotubuli dienen vor allem der dynamischen Stabilisierung des Zytoplasmas. Sie werden dort aufgebaut wo Vorwölbungen und Fortsätze ausgebildet werden. Abgebaut werden sie dort, wo Einziehungen entstehen. Bei Ordnungsprozessen in der Zelle wirken Mikrotubuli-assoziierte Proteine mit, die gleichzeitig die Mikrotubuli stabilisieren und der Interaktion mit anderen Zellbestandteilen dienen. Ferner spielen die Mikrotubuli für den intrazellulären Transport von Partikeln oder Mitochondrien sowie als Leitstruktur für den transzellulären Transport eine wichtige Rolle (24,47,149).

Mikrofilamente bestehen aus polymerisiertem Aktin, einem globulären Protein. Sie haben einen Durchmesser von 6 nm und können eine Länge von bis zu 1 µm in quergestreifter Muskulatur erreichen. Aktinfilamente sind untereinander durch Filamin verknüpft (149). In den Hepatozyten sind sie im Bereich der kanalikulären Membran und der Mikrovilli konzentriert (192). Aktinfilamente wirken bei der Ausbildung von Protrusionen bzw. Membraneinziehungen der Zelloberfläche mit.

Aktinfilamente und integrale Membranproteine werden durch die Proteine der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Familie verknüpft, diese sind essentiell für Zellbeweglichkeit, kortikale Aktinorganisation, Zelladhäsion und Zellproliferation (16,116,180). Radixin beispielsweise ist in den Mikrovilli der kanalikulären Membran lokalisiert. Es ist unerlässlich für die korrekte Lokalisierung von MRP2, welche neben der regelhaften Expression maßgebend für dessen physiologische Funktion ist. So führt ein *Knock-out* des Radixin in Mäusen zu einer verminderten Sekretion von konjugiertem Bilirubin (81).

1.4 Lebererkrankungen mit Störungen des hepatobiliären Transports

Der Gallenfluss ist ein osmotisch abhängiger Prozess, getrieben durch den vektoriellen Transport von löslichen Stoffen aus dem sinusoidalen Kompartiment oder dem Zytoplasma in das kanalikuläre Lumen. In der sinusoidalen Membran befindet sich der elektrogene 2:1 Na⁺/ Taurocholat-Kotransporter (Ntcp), welcher insbesondere die Aufnahme von konjugierten Gallensäuren vermittelt (118,178).

Die Exkretion von Xenobiotika und amphiphatischen Kationen wird vermittelt durch das *multidrug resistance protein 1* (MDR1), während Phospholipide durch das *multidrug resistance protein 3* (MDR3) in die Galle transportiert werden (79).

Die organischen Anionentransporter (OATPs), welche einen Anionentauscher darstellen und zum Teil durch den Export von Gluthation getrieben werden, ermöglichen im Gegensatz zum Ntcp einen natriumunabhängigen Transport von Gallensalzen. Sie bilden multispezifische Transportsysteme, die vor allem

amphiphatische organische Verbindungen wie konjugierte oder nicht konjugierte Gallensalze aber auch Bilirubin befördern (50,97,177).

In cholestatischen Tiermodellversuchen und bei Patienten mit cholestatischer Erkrankung konnte eine veränderte Expression von hepatozellulären Transportsystemen identifiziert werden (76, 164, 195). So kann bei Patienten mit Cholestase eine verminderte Expression des Ntcp auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene beobachtet werden (76, 164, 195).

OATPs werden möglicherweise bei Patienten mit Cholestase hochreguliert. Dies liegt unter anderem daran, dass der OATP als bidirektionaler Transporter fungieren und somit zu einer Verminderung von intrazellulären toxischen Gallensalzen führen kann (96,127). In cholestatischen Tiermodellen und in Leberbiopsien von Patienten mit Cholestase konnte gezeigt werden, dass die Expression des MRP2 deutlich reduziert ist, während die Expression des Gallensäuretransporters BSEP nur wenig vermindert zu sein scheint (107,110). Die Expression des MDR1 und die des MRP3 werden hingegen hochreguliert (61, 76, 95, 176, 195).

Bei den meisten cholestatischen Erkrankungen finden sich Veränderungen des Zytoskeletts, sowie Zerstörungen von Mikrotubuli, Anhäufung von Intermediärfilamenten und desorganisierte Aktinbündel in der perikanalikulären Umgebung (139).

Diese zytoskelettalen Veränderungen resultieren im Verlust von apikalen Mikrovilli und einer abgeschwächten kanalikulären Kontraktilität. In Tiermodellen konnte ebenfalls eine Störung im Bereich der *tight-junctions* gefunden werden, welche in einer vermehrten parazellulären Permeabilität resultiert.

Seit einiger Zeit sind cholestatische Erkrankungen bekannt, denen Mutationen verschiedener ABC-Transporter zugrunde liegen. Bei der erstmals beschriebenen *Byler-Disease* [progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC Typ I)] handelt es sich um eine hereditäre Erkrankung, der eine Mutation einer P-Typ ATPase, dem so genannten FIC1, zugrunde liegt. Die genaue Rolle dieser ATPase im hepatobiliären Transport ist noch nicht vollends geklärt, jedoch wird eine Beteiligung als ein Aminophospholipid-Austauscher diskutiert (21,178,181). Diese Patienten zeigen eine ausgeprägte Cholestase mit hohen Gallensäureserumspiegeln bei gleichzeitig niedriger γ -GT. Der PFIC Typ II ist durch eine Mutation im Gen,

welches für den BSEP kodiert, gekennzeichnet (169). Beim PFIC Typ III liegt eine Mutation des MDR3 vor (30).

Mutationen der MRP2 Expression führen beim Menschen zum Dubin-Johnson Syndrom. Dabei handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung, die 1954 sowohl von Dubin und Johnson (34), als auch von Sprinz und Nelson (163) unabhängig voneinander beschrieben worden ist. Molekularbiologisch liegen bei dieser Erkrankung Mutationen vor, die entweder zu einem funktionsgeminderten bis funktionslosen oder zu einem völligen Fehlen des MRP2 Transportproteins führen (72,136,138). Bisher sind über zehn verschiedene Mutationen bekannt. Diese beinhalten *Splice-Site-Mutationen* (70,175), *Missense-Mutationen* (77,122,175,186), *Nonsense-Mutationen* (138,174) und Deletionen (179). Alle diese Mutationen führen zu einer Störung im kanalikulären Transportsystem für Konjugate organischer Anionen mit Glukuronsäure und Gluthation (72,148).

Darüber hinaus besteht bei diesen Patienten eine isolierte konjugierte Hyperbilirubinämie (138), verbunden mit einem chronischen oder intermittierenden nichthämolytischen Ikterus, teilweise mit abdominellen Schmerzen und Hepatomegalie (85). Meistens wird die Diagnose zwischen dem 10. und 30. Lebensjahr gestellt. Des Weiteren findet sich bei diesen Patienten eine vermehrte Ausscheidung von Koproporphyrin III. Histologisch weisen die Patienten eine vermehrte dunkle Pigmentablagerung perikanalikulär in den Hepatozyten auf (32). Diese Pigmente enthalten neben Melanin auch Epinephrin-Metabolite, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (194). In der Literatur sind Einzelfälle von Dubin-Johnson Patienten mit einem Hepatozellulären Karzinom beschrieben (37). Ein kausaler Zusammenhang der beiden Erkrankungen lässt sich jedoch aufgrund niedriger Fallzahlen nicht nachweisen (37). So ist in der Regel eine Therapie dieser gutartig verlaufenden Erkrankung nicht erforderlich, zumal eine kausale oder symptomatische Therapie nicht bekannt ist (101).

1.5 Aufbau und Funktion von Signalkaskaden am Beispiel der p38 MAP-Kinasen

Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen besitzen eine zentrale Rolle in der durch Protein-Phosphorylierung und Dephosphorylierung vermittelten Signaltransduktion. Diese übermitteln Signale von der Plasmamembran zu nukleären und zytoplasmatischen Zielstrukturen (19,38,104,147).

Es werden drei wesentliche Subklassen unterschieden: die p38 MAP-Kinasen (MAPK), c-Jun N-terminale Kinasen (c-JNK) und die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK-1/2). Die ERK-1/2 werden insbesondere durch Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren stimuliert (69). Sie sind vorwiegend an der Regulation der Meiose, der Mitose und der postmitotischen Vorgänge in differenzierten Zellen, aber auch an Vorgängen wie Lernen und Gedächtnisbildung im Zentralnervensystem beteiligt (69).

Die JNKs gehören zu den durch Stress aktivierbaren Kinasen. Sie sind eine Komponente des Aktivator-Protein-1 (AP-1) Transkriptionskomplexes, der ein wichtiger Regulator der Genexpression ist. Des Weiteren sind die JNKs auch zu einem erheblichen Teil an der Kontrolle der Apoptose beteiligt (18).

Bei den p38 MAP-Kinasen, die bei Untersuchungen zur Hemmung der TNF- α induzierten-inflammatorischen Antwort entdeckt worden sind (65), sind mittlerweile vier Isoformen differenziert worden, p38 α , p38 β , p38 γ und die p38 δ (68,69,111,188). Die p38 α MAP-Kinase mit einer molekularen Masse von etwa 38 kDa wurde als erste isoliert (54,55). Die p38 α und die p38 β MAP-Kinase sind im Menschen ubiquitär in den verschiedenen Geweben vorhanden (68). Die p38 γ MAP-Kinase ist hauptsächlich in der Skelettmuskulatur zu finden (106,111), die p38 δ MAP-Kinase dagegen besonders in der Lunge, den Nieren, den Hoden, dem Pankreas und im Dünndarm (100). Die p38 MAP-Kinase Unterformen weisen mindestens 60% Identitätsübereinstimmung untereinander auf, während nur eine 40-prozentige Übereinstimmung zu den anderen MAP-Kinasen besteht (134).

Die p38 MAP-Kinase wird unter anderem durch Stress, wie Hitze oder osmotische Schwankungen, aber auch durch Hormone oder durch inflammatorische Zytokine aktiviert. Die p38-MAP-Kinase spielt eine große Rolle bei der Aktivierung der Immunantwort, bei der Regulierung der Entzündungsmediatoren bei entzündlichen Prozessen (69), sowie bei der Regulierung von Zellwachstum und Zelltod (134). Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase führt zu Signaltransduktion in den Zellkern und zur Aktivierung der respondierenden Gene (134).

Es ist anzunehmen, dass *Cross-Talks* zwischen den Transduktionswegen der MAP-Kinasen existieren. Auch ist die Substratspezifität der MAP-Kinasen überlappend. Die MAP-Kinasen Signalwege sind in der Hefe und auch in höheren Eukaryonten modular organisiert (siehe Abb. 3). Dies korreliert mit einer erhöhten Spezifität der Phosphorylierungskaskaden (191). Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch spezifische MAP-Kinasen-Kinasen (MKKs). Hierbei handelt es sich um Proteinkinasen mit dualer Spezifität, welche Threonin und Tyrosin innerhalb eines charakteristischen, drei Aminosäuren umfassenden Motivs der MAP-Kinasen phosphorylieren können. Diese MKKs werden durch so genannte MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MKKKs) Serin/Threonin phosphoryliert und dadurch aktiviert.

Im Laufe der Evolution sind eine Vielzahl der Komponenten dieser drei Kinasen Module (MKKK-MKK-MAPK) in der Hefe und in höheren Eukaryonten konserviert geblieben. Die Inaktivierung der MAP-Kinasen erfolgt zum einen durch MAP-Kinase-Phosphatasen (MKPs), die durch so genannte *'immediate early genes'* kodiert und transkriptionell reguliert werden (80).

Zum anderen werden MAP-Kinasen durch Protein-Phosphatasen, wie der Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A (PP2A), durch Dephosphorylierung rasch in ihrer Aktivität terminiert (2).

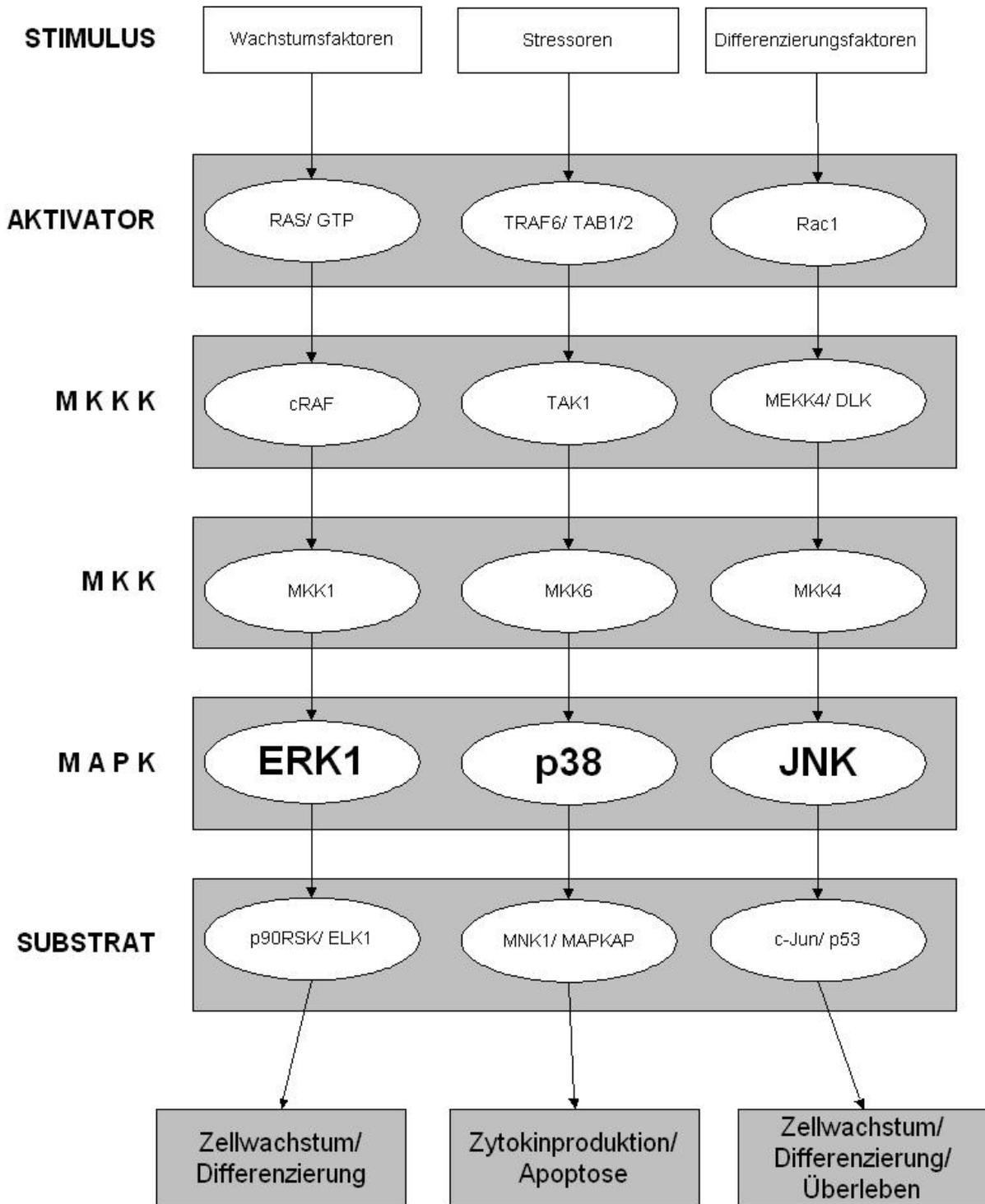


Abb. 3: Signalkaskaden anhand der MAP-Kinasen in Säugetierzellen

Die MAP-Kinasen werden im Rahmen der Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Proliferationsfaktoren und Stressoren mittels Phosphorylierung aktiviert. MAP-Kinasen ihrerseits können verschiedene zytosolische und nukleäre Substrate phosphorylieren und dadurch Einfluss auf die Regulation des zellulären Metabolismus, der Genexpression und Signaltransduktion nehmen. In dieser Graphik sind aus Gründen der Übersicht bestehende *Cross-Talks* nicht berücksichtigt.

2. Fragestellung

Diese Arbeit befasst sich mit der intrazellulären Verteilung des MRP2 in humanen Hepatomazellen und dessen Regulation. Dabei wird untersucht, wodurch sich die Menge von MRP2 in der kanalikulären Membran beeinflussen lässt und über welchen Signalweg diese vermittelt wird. Des Weiteren wird der Frage nach intrazellulären Reservoirs nachgegangen und es wird eine Abhängigkeit der Effektvermittlung von zytoskelettalen Strukturen untersucht.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Die für die Versuche notwendigen HepG2-Zellen wurden von *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas/USA) bezogen. Das Zellkulturmedium (DMEM), Penicillin und Streptomycin wurden von Biochrom (Berlin/BRD) erworben. Die nicht essentiellen Aminosäuren und Genistein wurden von GIBCO BRL (Karlsruhe/BRD) erstanden.

Die Zellen wurden auf *6-well* und *24-well* Kulturplatten von Falcon (Heidelberg/BRD) kultiviert.

Die Proteinsyntheseinhibitoren Cycloheximid und Anisomycin und Tritc-Phalloidin stammten von Sigma (Deisenhofen/BRD). Gö 6850 und PD 098059 wurden von Calbiochem (Bad Soden/BRD) bezogen.

Der Inhibitor der p38 MAP-Kinase SB 202190 und das inaktive Analogon SB 202474 wurden von Alexis (Grünberg/BRD) bezogen. Transfektionen wurden mit Lipofectamine plus von Life Technologies (USA) durchgeführt.

Die Datenerhebung erfolgte mikroskopisch mit einem Axioskop von Zeiss (Oberkochen/BRD). Die Dokumentation erfolgte mit einer Restlicht Kamera von Intas (Göttingen/BRD). Zur weiteren Untersuchung wurde ein konfokales Laserskanningmikroskop TCS-NT auf dem inversen Mikroskop DM IRB von Leica (Bensheim/BRD) genutzt.

Für die Western-Blot Analyse ist der *semi dry transfer* Horizontalapparat, Multiphor II Elektrobloitingapparat von Pharmacia (Freiburg/BRD) verwendet worden, die Dokumentation erfolgte auf Kodak X-Omat AR Röntgenfilme von Kodak (Stuttgart/BRD).

Sämtliche hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt/BRD), Sigma-Aldrich (Deisenhofen/BRD) oder Roche Molecular Biochemicals (Mannheim/BRD) in der höchst verfügbaren Reinheit bezogen.

3.2 Zellkultivierung

In dieser Studie wurden humane HepG2-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine gut differenzierte humane Hepatoma-Zelllinie, die wie Hepatozyten eine Polarisierung aufweisen (67,86). Sie sind in der Lage, Strukturen zu bilden, die den Gallenkanälchen der Hepatozyten entsprechen. Diese sogenannten Pseudokanalikuli sind runde Strukturen mit Mikrovilli (22,161), die zwischen zwei oder mehr benachbarten Zellen ausgebildet und durch *tight junctions* abgedichtet werden. Sie enthalten Aktin, Villin (161,193) und spezifische apikale Proteine, weswegen sie ebenso wie die Gallenkanälchen der Hepatozyten mittels Immunfluoreszenz gut anfärbbar sind.

Dieser Zellentyp diente bereits als Versuchsmodell, um ABC-Transporter nach deren Lokalisation und Möglichkeiten der Steuerung zu untersuchen (90).

Dabei zeigte sich, dass die HepG2-Zellen eine Vielfalt von ABC-Transportern exprimieren, wie MRP1 (108,144) und MRP2 (20,90,144), das sie zur apikalen Membran befördern können (90,143). Weiterhin exprimieren sie MRP3 (108,153), MRP4 (142), MRP5 (153), MRP6 (108), MDR1 (108) und BSEP (92).

Die Zellen wurden in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), welches 10% *fetale bovine serum* (FBS), 4.5 g/l Glucose, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml und 80 mg/l nicht essentielle Aminosäuren enthielt, bei 5% CO₂ und 37°Celsius in einem Brutschrank kultiviert.

Die Zellen wurden bei Subkonfluenz passagiert. Dazu ist zuerst das Medium abgesaugt worden. Danach wurde 37°Celsius warmes Trypsin/EGTA auf die Zellen gegeben, welches nach zwei Minuten durch 5 ml neues Trypsin/EGTA ersetzt wurde. Nach 5 Minuten im Brutschrank wurden die Zellen durch Klopfen vom Untergrund gelöst und in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) gegeben. Der Inhalt dieses Falcon-Röhrchens wurde für 1 Minute zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Zell-Pellet mit 10 ml Medium resuspendiert. Von dieser Suspension ist 1 ml durch einen *Cellstrainer* mit einer Siebgröße von 70 µm in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) filtriert worden. Die filtrierte Lösung wurde mit 49 ml Medium ergänzt. Von diesen 50 ml wurden je nach Bedarf entweder 12,5 ml in eine Zellkulturflasche oder 2 ml je *well* in eine 6-*well* Platte oder 0.5 ml je *well* in eine mit Deckgläsern bestückte 24-*well* Platte gegeben.

Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank inkubiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurde der erste Medienwechsel durchgeführt. Anschließend erfolgte der Medienwechsel je nach Bedarf der Zellen. Der letzte Medienwechsel wurde 12 h vor Versuchsbeginn durchgeführt. Für die Experimente wurden subkonfluente HepG2-Zellen verwendet.

3.3 Versuchsdurchführung

3.3.1 Cycloheximid Konzentrationsreihe

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die ideale Dosis-Wirkbeziehung von Cycloheximid bezüglich des MRP2 *Targetings* zu ermitteln. Cycloheximid (siehe Abb.4) ist ein Chemotherapeutikum mit antibiotischer und antimykotischer Aktivität, das aus dem Bakterium *Streptomyces griseus* gewonnen wird (112). Des Weiteren handelt es sich um einen Hemmstoff der Proteinbiosynthese auf der Ebene der Peptidelongation (112). Für diese Versuche sind Stammlösungen mit einer 1000-fach höheren Konzentration verwendet worden, die in DMSO 1⁰/₁₀₀ (Dimethylsulfoxid) gelöst waren.

Zu Versuchsbeginn sind Medium als Kontrollbedingung in Spalte 1, in Spalte 2 Cycloheximid 0.1 µmol/l, in Spalte 3 Cycloheximid 1 µmol/l, in Spalte 4 Cycloheximid 10 µmol/l, in Spalte 5 Cycloheximid 50 µmol/l und in Spalte 6 Cycloheximid 100 µmol/l appliziert worden.

Das so präparierte 24-*well* wurde für 6 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend sind die Deckgläser mit Methanol (-20°Celsius) für 10 Minuten fixiert worden.

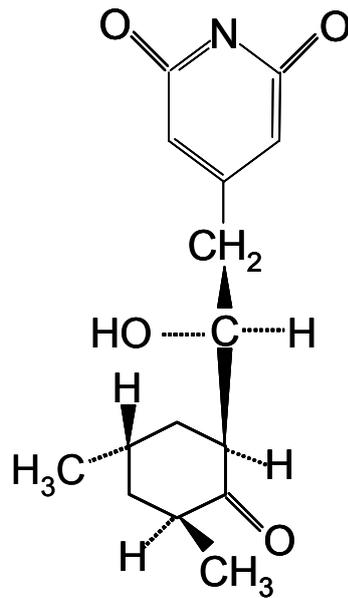


Abb. 4: Strukturformel Cycloheximid. $C_{15}H_{23}NO_4$

3.3.2 Cycloheximid Zeitreihe

Zur Bestimmung des von Cycloheximid induzierten MRP2 *Targetings* ist dieses Experiment mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Cycloheximid und dazugehörigen Kontrollen durchgeführt worden.

Dazu sind 10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Cycloheximid verwandt worden. Um einen Zeitverlauf des MRP2 *Targetings* zu erhalten wurden die Ansätze nach festen Zeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h) für 10 min mit Methanol (-20°Celsius) fixiert worden.

3.3.3 Cycloheximid und Inhibitoren

Zu Versuchsbeginn wurde in Spalte 1 und 2 ein Medienwechsel durchgeführt. In Spalte 3 und 5 wurde jeweils Medium zugegeben, das SB 202190 in einer Konzentration von 500 nmol/l enthielt. Bei SB 202190 handelt es sich um ein

Pyridinyl-Imidazol Derivat, das die Fähigkeit aufweist, die p38 MAP-Kinase zu binden und somit ihre Aktivität zu inhibieren (26,109).

In Spalte 4 und 6 wurde Medium appliziert, das SB 202474 in einer Molarität von 500 nmol/l enthielt, SB 202474 ist das inaktive Analogon des SB 202190 (109). Die Zellen wurden für 0.5 h mit dem Inhibitor bzw. dem inaktiven Analogon bei 37° C inkubiert. Danach wurde das gesamte Medium aus dem 24-well entfernt. Daraufhin wurde in Spalte 1 nur Medium, in Spalte 2 Cycloheximid (10 µmol/l), in Spalte 3 Cycloheximid (10 µmol/l) und SB 202190 (500 nmol/l), in Spalte 4 Cycloheximid (10 µmol/l) und SB 202474 (500 nmol/l), in Spalte 5 nur SB 202190 (500 nmol/l) und in Spalte 6 nur SB 202474 (500 nmol/l) appliziert (siehe Abb. 5).

Die Zellen in diesem 24-well wurden jeweils für 4 h bzw. 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurden die Deckgläser aus Zeile 1 und 2 und nach 6 h die der Zeilen 3 und 4 mit Methanol (-20°Celsius) für 10 min fixiert.

Zeit [h]	Kontrolle	Cyclo [µmol/l]	Cyclo+SB190 [µmol/l]+[nmol/l]	Cyclo+SB474 [µmol/l]+[nmol/l]	SB190 [nmol/l]	SB474 [nmol/l]
4	0	10	10+500	10+500	500	500
6	0	10	10+500	10+500	500	500

Abb. 5: Schematischer Versuchsaufbau: Cycloheximid + SB202190/ SB202474

Das Schema zeigt die verschiedenen Versuchsbedingungen und den Applikationsort der Versuchsstoffe. Cyclo (Cycloheximid), SB 190 (SB 202190), SB 474 (SB 202474).

3.3.4 Cycloheximid und Cytochalasin D

Bei diesem Versuch ist mit vier verschiedenen Ansätzen gearbeitet worden. In Zeile 1 und 2 ist zu Versuchsbeginn ein Medienwechsel durchgeführt worden. In Zeile 3 und 4 ist Cytochalasin D in einer Molarität von 1 µmol/l appliziert worden. Nach 0,5 h Inkubation sind sie durch folgende neue Ansätze ersetzt worden. In Zeile 1 ist Medium als Kontrollbedingung, in Zeile 2 Cycloheximid (10 µmol/l), in Zeile 3

Cycloheximid (10 $\mu\text{mol/l}$) und Cytochalasin D (1 $\mu\text{mol/l}$) und in Zeile 4 Cytochalasin D (1 $\mu\text{mol/l}$) appliziert worden. Die Versuchsdauer betrug 6 h. Die Fixierung mit Methanol ist sowohl für 45 s als auch für 10 min durchgeführt worden.

3.3.5 Cycloheximid und Colchicin

Diese Versuchsanordnung umfasste vier Versuchsbedingungen zur Untersuchung der zytoskelettalen Abhängigkeit des MRP2 Transporters *Targetings*. Die erste war die Kontrolle, die zweite war Cycloheximid (10 $\mu\text{mol/l}$). Die dritte Bedingung bestand aus Cycloheximid (10 $\mu\text{mol/l}$) und Colchicin (5 $\mu\text{mol/l}$). Colchicin (5 $\mu\text{mol/l}$) war die vierte Versuchsbedingung. Die Versuchsdauer betrug 4 h und 6 h. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Methanol.

3.3.6 Anisomycin Zeit-Konzentrationsreihe

Durch diese Versuchsanordnung ist sowohl die Kinetik, als auch die Dosis-Wirkbeziehung von Anisomycin, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese und der MAP-Kinasen p38, ERK und der cJNK (7,39,64,73,82), in Bezug auf das *Targeting* der MRP2 Transporter untersucht worden. Für diese Versuche sind Stammlösungen mit einer 1000-fach höheren Konzentration verwendet worden, die in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst waren.

Der Versuch wurde mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: Anisomycin (0.001 $\mu\text{mol/l}$), Anisomycin (0.01 $\mu\text{mol/l}$), Anisomycin (0.1 $\mu\text{mol/l}$), Anisomycin (1 $\mu\text{mol/l}$), Anisomycin (10 $\mu\text{mol/l}$). Die Kontrollbedingung war Medium. Die Versuchsdauer betrug 4 h und 6 h. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Methanol.

3.3.7 Cycloheximid und PD 098059

Diese Versuchsreihe wurde mit PD 098059 , einem Hemmstoff der ERK MAP-Kinase (1,76), in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Es wurden 4 Ansätze

benötigt. Kontrolle (nur Medium), Cycloheximid 10 µmol/l, Cycloheximid zusammen mit PD 098059 und PD 098059 alleine. Die Versuchsdauer betrug 6 h.

3.3.8 Cycloheximid und Gö 6850

Dieser Versuch wurde mit Gö 6850, einem Inhibitor der Proteinkinase C (5,53,106), in einer Konzentration von 1 µmol/l nach dem gleichen Schema wie der Versuch mit PD 098059 durchgeführt worden.

3.4 Zelltransfektion

Subkonfluente HepG2-Zellen sind mit einer Plasmid DNA transfiziert worden, die für eine konstitutiv aktive MKK6 kodiert (114). Es wurden 0.4 µg Plasmid DNA je *well* appliziert. Die MKK6 ist eine MAP-Kinase-Kinase, welche durch Phosphorylierung alle bisher bekannten Isoformen der p38 MAP-Kinase aktiviert (134). Diese wurde in pcDNA3 eingefügt, welche mit einem FLAG-Epitop markiert wurde (141). Bei dieser MKK6 ist die konstitutive Aktivität dadurch erreicht worden, dass die Tyrosin-aktivierende Phosphorylierungsstelle durch Glutamat ersetzt worden ist (12,140). Der für die Transfektion benötigte Ansatz wurde auf der Grundlage eines 24 *wells* entsprechend den Herstellerangaben (Life Technologies) berechnet, wobei je ein Ansatz aus 2,4 µg pcDNA3 bzw. pcDNA3-MKK6, 6 µl Lipofectamine, 24 µl Plus Reagens und 300 µl DMEM für eine Zeile bestimmt war.

Bedingung	T [h]	T [h]	T [h]	T [h]
pcDNA3	3	6	9	24
pcDNA3-MKK6	3	6	9	24

Abb. 6: Versuchsanordnung der MKK6-Lipotransfektion

Das Schema gibt die unterschiedliche Versuchsdauer [T] und die verschiedenen Versuchsbedingungen [Bedingung] wieder.

In Spalte 1 erfolgte die Zellfixierung nach 3 h, in allen anderen ist das Medium nach 6 h durch DMEM Medium ersetzt worden.

Die weiteren Zellfixierungen erfolgten nach 6 h ,9 h und 24 h. Anschließend sind die fixierten Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (siehe 3.5) weiter analysiert worden.

3.5 Immunfluoreszenz

Die Deckgläser, auf denen sich die Zellen befanden, wurden in einem *24-well* für 10 Minuten mit Methanol (- 20° Celsius) fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen.

Die gewaschenen Zellen wurden mit Triton X 100 (0.1% in PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt, um diese zu permeabelisieren. Es erfolgte die zweimalige Waschung mit PBS bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Zellen mit Rinderserumalbumin 1 % (BSA 1%) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren.

Die inkubierten Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper, dafür wurden 25 µl des in BSA 1% in PBS gelösten Antikörpers (siehe Tabelle 1) auf das jeweilige Deckglas appliziert.

Die Zellen auf den Deckgläsern wurden für zwei Stunden in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach diesen zwei Stunden wurde der Antikörper dreimal mit PBS von den Zellen gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (siehe Tabelle 2). Die Zellen wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen.

Um die Zellkerne darzustellen sind die Zellen mit dem Eindeckmedium DAPI/Vecta Shield (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) beschichtet und auf Objektträgern fixiert worden. Dieses Eindeckmedium kann mit DNA fluoreszierende Komplexe bilden (siehe Abb. 7).

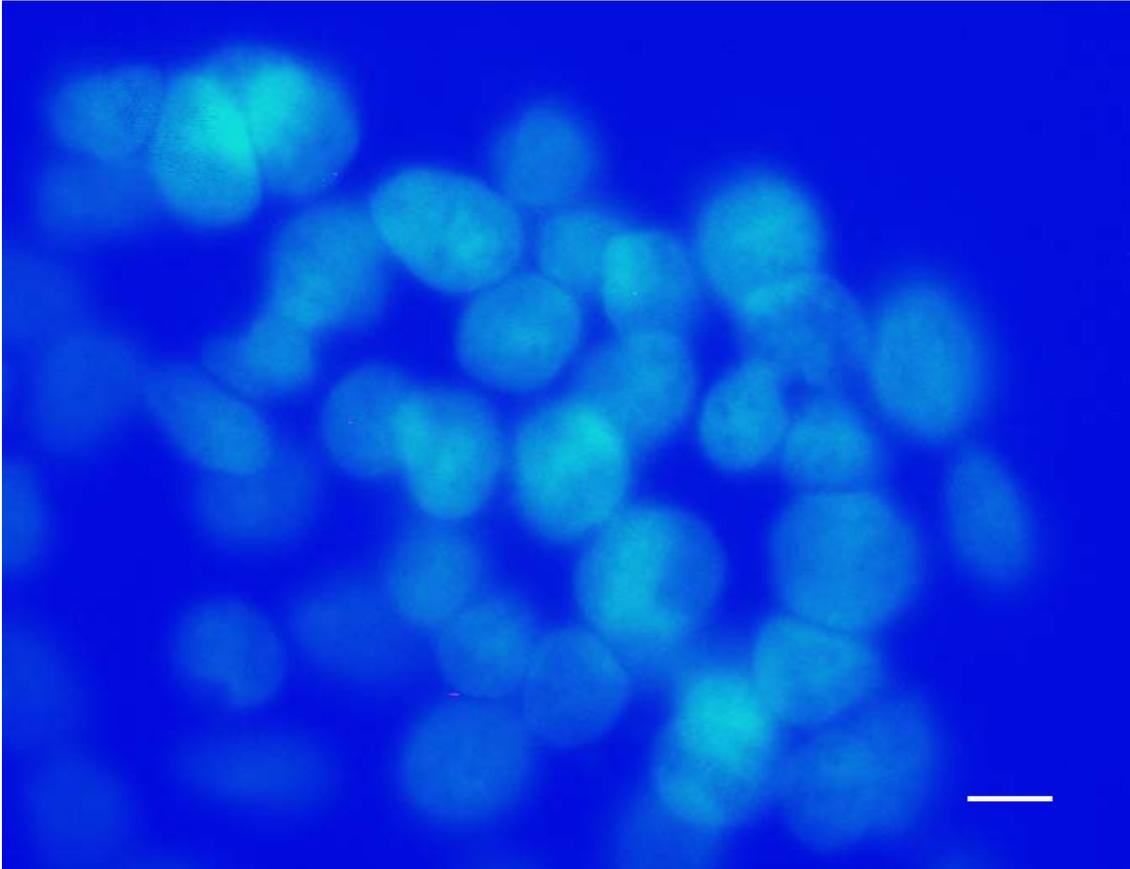


Abb. 7: Zellkernfärbung mit DAPI

Dargestellt ist die Zellkernfärbung von HepG2-Zellen, die für die Berechnung des Quotienten aus Pseudokanalikuli und Zellkernen benötigt wurde. Der weiße Balken entspricht 10 μm .

Primär Antikörper

Antikörper	Wirtstier	Antigen	Bezugsquelle
EAG 5	Kaninchen	MRP2	Prof. Keppler, DKFZ Heidelberg/ Deutschland
M2I-4	Maus	MRP2 (Aminosäuren 215-310)	Alexis Grünberg/Deutschland
M2III-6	Maus	MRP2 (Aminosäuren 238-247)	Alexis Grünberg/Deutschland
K 4	Kaninchen	Ntcp der Ratte	Dr. Stieger & Prof. Meier, Kantonhospital Zürich/Schweiz
Anti-Villin	Ziege	Strukturprotein Villin	Chemicon Tenecula/USA
Anti-active p38^{MAPK}	Kaninchen	Aktivierte p38 ^{MAPK}	Stressgen/USA
Anti-total p38^{MAPK}	Kaninchen	Gesamt p38 ^{MAPK}	Promega /USA

Tabelle 1: Tabelle der verwendeten Primärantikörper

Die Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper mit Angabe der Antigene und der Bezugsquelle

Sekundär-Antikörper

Antikörper	Wirtstier	Antigen	Bezugsquelle
FITC	Ziege	Kaninchen/ Maus IgG	Jackson Immuno Research Laboratories West Grove/USA
CY 3	Ziege	Kaninchen/ Maus IgG	Jackson Immuno Research Laboratories West Grove/USA
IgG-POD	Schaf	Kaninchen IgG	Boehringer Mannheim Mannheim/BRD

Tabelle 2 : Tabelle der verwendeten Sekundär-Antikörper

Die Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper mit Angabe der Antigene und der Bezugsquelle

3.6 Western-Blot

HepG2-Zellen sind mit und ohne Cycloheximid 100 µmol/l für bis zu 6 h inkubiert worden. Danach sind diese Zellen lysiert worden. Die gewonnenen Gesamtproteinlysate wurden bei 4°Celsius in RL-Puffer gelöst (Tris/HCl (pH 7.2): 50 mmol/l, NaCl: 150 mmol/l, NaF: 40 mmol/l, EDTA: 5 mmol/l, EGTA: 5 mmol/l, Natriumorthovanadat: 1 mmol/l, Phenylmethylsulfonylflourid), welchem 0.1% Aprotinin, 1% Nonidet P 40, 0.1% Natriumdesoxycholat und 0.1% SDS zugesetzt war. Die Homogenisate wurden bei 20.000 g und 4°Celsius für 20 Minuten zentrifugiert.

Die Überstände wurden mit Probenpuffer (0.1 mol/l Tris (pH 6.8), 20% Glyzerin, 3.5% SDS, 200 mmol/l Dithiothreitol (DTT), 0.1% Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 versetzt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 95°Celsius inkubiert. Die Proteinlysate wurden schließlich durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese getrennt (105).

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Gele mit Transferpuffer (Glycin: 39 mmol/l, Tris: 48 mmol/l, 0.03% SDS, 20% Methanol) equilibriert und die Proteine mittels eines `semi dry transfer` Apparates (Pharmacia, Freiburg) auf Nitrozellulosemembran transferiert. Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch Behandlung mit 5% Rinderserumalbumin [BSA, in 20 mmol/l Tris (pH 7.5), 150 mmol/l NaCl, 0.1% Tween] blockiert. Daraufhin wurde die Membran bei 4°Celsius über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 h mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 Minuten mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem zweiten an Peroxidase gekoppelten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurde mit dem `enhanced chemiluminescent detection` System (Amersham, Braunschweig) die Antikörperbindung detektiert.

3.7 Datenerhebung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse mussten die HepG2-Zellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt werden. Die Zellkerne wurden mit 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) gefärbt, so dass diese bei Anregung mit UV-Licht blau fluoreszierten. MRP2 wurde mit den Antikörpern EAG 5 oder mit M2I-4 detektiert (27,129) (siehe Tabelle 1). Dieser Komplex ist mit einem zweiten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper visualisiert worden. Es wurden in Ziegen generierte Antikörper verwendet, welche gegen Kaninchen- oder Maus-IgG gerichtet waren (siehe Tabelle 2).

Zur Zählung ist ein Objektiv mit einer 40fachen Vergrößerung genutzt worden. Bei dem Mikroskop handelte es sich um ein Axioskop (Zeiss Oberkochen/BRD). Es wurden pro Versuchsbedingung 10 Zählfelder ausgewertet, die zufällig gewählt waren, d.h. ohne dass die Versuchsbedingungen bekannt waren.

Die ausgewerteten Zählfelder sind mit einer Restlicht Kamera dokumentiert worden, die an das Axioskop angeschlossen war. Alle Zellkerne und Pseudokanalikuli wurden für jedes Gesichtsfeld gezählt. Es fanden sich in der Regel 30 bis 150 Zellkerne und

0 bis 30 Pseudokanalikuli pro Gesichtsfeld. Es wurde der Quotient aus den Pseudokanalikuli und den Zellkernen berechnet und statistisch ausgewertet.

3.8 Statistik

Alle ermittelten Daten wurden anhand von mindestens drei zeitlich unabhängigen Experimenten ($n \geq 3$) mit HepG2-Zellen erhoben. Dabei wurden pro Experiment zehn Gesichtsfelder je Bedingung in geblindeter Versuchsanordnung ausgewertet. Innerhalb der Experimente wurde mit Hilfe von Microsoft Excel (Version 2000) der Mittelwert und die Standardabweichung der erhobenen Daten berechnet. Auf Grund der Tatsache, dass je Experiment zehn Werte zur Verfügung standen und diese Werte nicht immer eine Normalverteilung aufwiesen, konnte die statistische Auswertung nicht mit Hilfe eines Student-t-Test durchgeführt werden. Stattdessen musste eine statistische Auswertung erfolgen, die unabhängig von der Normalverteilung der erhobenen Daten ist.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Rangsummentest. Diese Tests sind verteilungsfreie, nicht-parametrische Tests, die keine bestimmte Verteilungsform voraussetzen. Sie basieren auf eine Methode des Mathematikers Frank Wilcoxon (1892-1965) (189). Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ gewählt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 12.0) von SPSS Inc. (Chicago/USA).

4. Ergebnisse

4.1 Bildung von Pseudokanalikuli in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen bilden Pseudokanalikuli zwischen benachbarten Zellen aus, die den Kanalikuli in der intakten Leber entsprechen.

Die pseudokanalikuläre Membran ist von der basolateralen Membran durch den *tight-junction* Komplex getrennt, zu dem Proteine wie Occludin oder das Zonula Occludin Protein 1 (ZO-1) zählen (90). Die Pseudokanalikuli enthalten unter anderem auch die für die apikale Region typischen Proteine, wie Villin, ein Strukturprotein der kanalikulären Mikrovilli oder das Ektoenzym Dipeptidylpeptidase (DPP) IV (90). Weiterhin finden sich in den Pseudokanalikuli verschiedene ABC Transporter (Transport ATPasen), wie MRP2 (20,90), P-Glykoprotein oder der Gallensäuretransporter (BSEP) (92).

Es fanden sich $9,7 \pm 0,6$ Pseudokanalikuli pro hundert ausgezählte Zellen. In Übereinstimmung mit einer bereits veröffentlichten Studie (90) wurde eine Ansammlung von MRP2 durch konventionelle Epifluoreszenz-Mikroskopie in den pseudokanalikulären Strukturen detektiert. Zusätzlich zeigte sich, dass MRP2 mit Villin (siehe Abb. 8 C) kolokalisiert und von dem *tight-junction* Protein ZO-1 umgeben ist. Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie konnte MRP2 zusätzlich in vesikelartigen Strukturen detektiert werden, welche sich innerhalb der Zelle befanden (siehe Abb. 9 A).

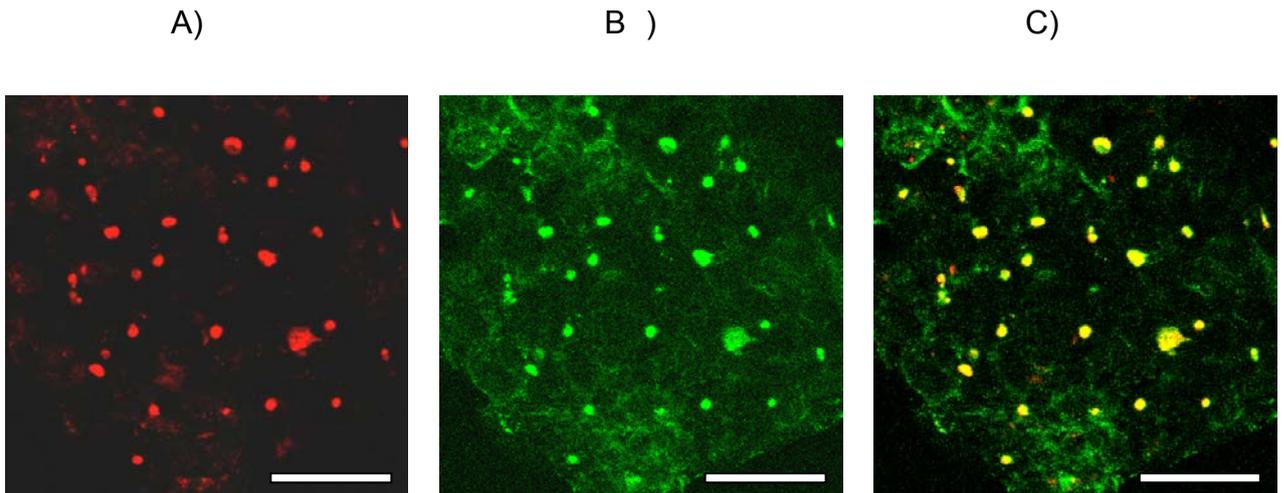


Abb. 8: Immunfluoreszenzdarstellung von MRP2/Villin

Dargestellt sind subkonfluente HepG2-Zellen. A) Die rot angefärbten Strukturen entsprechen dem MRP2. B) In dieser Färbung ist in denselben Zellen das Strukturprotein Villin immunfluoreszenstechnisch detektiert (grün) C) Diese Abbildung zeigt eine Kolokalisation von Villin und MRP2. Auf Grund der Überlagerung der beiden Farbtöne kommt es zu einer gelblichen Darstellung der Kolokalisation. Der weiße Balken entspricht 50 μm .

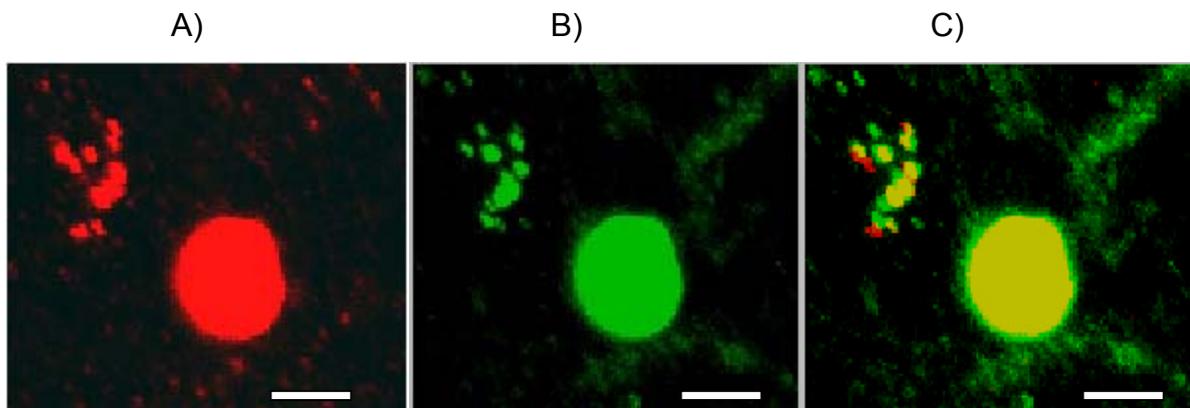


Abb. 9: Pseudokanalikus

A) Dargestellt ist ein MRP2 enthaltender Pseudokanalikus in humanen HepG2-Zellen. Zusätzlich erkennt man vesikelartige Strukturen um den Pseudokanalikus, die ebenfalls MRP2 enthalten. In diesem Pseudokanalikus erkennt man bei entsprechender immunfluoreszenter Färbung B), dass dieser ebenfalls Villin enthält. C) Bei gleichzeitiger Darstellung beider Proteine zeigt sich, dass diese im Pseudokanalikus kolokalisieren. Des Weiteren sieht man diese Proteine auch in vesikelartigen Strukturen um den Pseudokanalikus herum. In diesen Strukturen erkennt man aber nur eine teilweise Kolokalisation von MRP2 und Villin, ersichtlich an den einzelnen roten und grünen Strukturen, die keine Überlagerung zeigen. Der weiße Balken entspricht 1 μm .

4.2 Wirkung von Cycloheximid in HepG2-Zellen

Subkonfluente HepG2-Zellen sind mit Cycloheximid in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlicher Versuchsdauer behandelt worden. Des Weiteren sind verschiedene Inhibitoren zusätzlich appliziert worden, um den Signalweg des beobachteten Effekts zu untersuchen.

4.2.1 Zeitverlauf

Cycloheximid 10 μ mol/l

Der Kontrollwert betrug zum Zeitpunkt 0 h 10.3 ± 4.0 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Nach einer Stunde konnte man 11.1 ± 3.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (siehe Abb. 10). Nach 2 h stieg die Anzahl der Pseudokanalikuli weiter auf 14.8 ± 5.0 ($p=0.013$), bei 4 h lag der Wert bei 16.4 ± 3.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.013$). 6 h nach Versuchsbeginn wurden durch Cycloheximid 18.1 ± 4.9 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.005$) induziert. Dieser Wert sank nach 8 h auf 17.6 ± 3.7 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.007$). Nach 10 h konnte man nur noch $15,9 \pm 4.2$ Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.049$) zählen. Dies bedeutet, dass es bereits nach 2 h zu einem signifikanten Anstieg der gebildeten Pseudokanalikuli/100 Nuklei gekommen ist. Diese Steigerung setzt sich bis zu einem Maximum von einer ungefähren Verdopplung der Pseudokanalikuli/100 Nuklei nach 6 h im Vergleich zum Ausgangswert fort. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Absinken der relativen Anzahl, die bezogen auf den Kontrollwert aber immer noch signifikant höher ist.

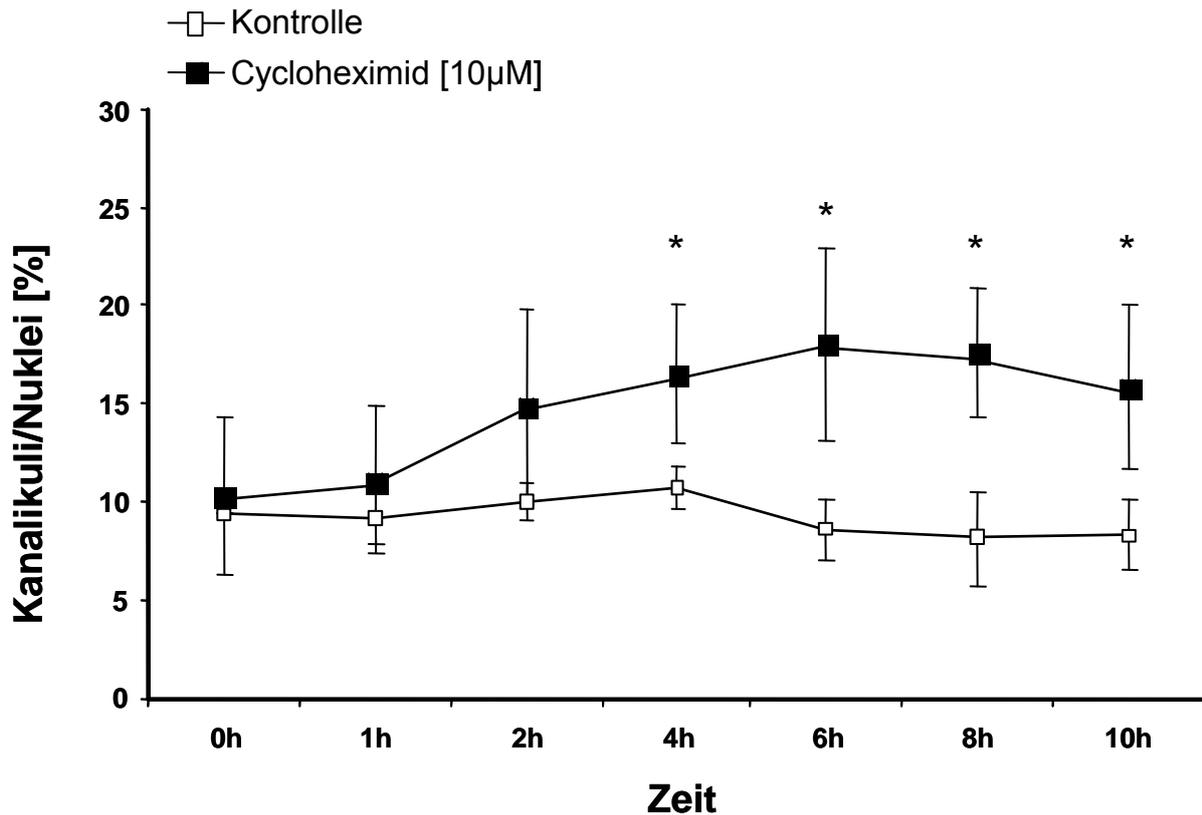


Abb. 10: Zeitabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Cycloheximid in einer Konzentration von 10 µmol/l.

Dargestellt ist die Abhängigkeit der Kanalikuli/Nuklei [%] von der Zeit, bei Applikation von Cycloheximid [10 µmol/l]. Es zeigte sich ein stetiger Anstieg, der bei 6 h sein Maximum entwickelt und danach wieder langsam abfällt. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten (n=3, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Quadraten und die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p < 0.05$, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

Cycloheximid 100 µmol/l

Bei dieser höheren Konzentration betrug der zum Zeitpunkt 0 h erhobene Kontrollwert 10.2 ± 2.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei, (siehe Abb. 11). Dieser Wert stieg nach einer Stunde auf 12.1 ± 3.6 Pseudokanalikuli/100 Nuklei an. Nach 2 h stieg der Wert auf 12.3 ± 3.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Erst nach 4 h konnte ein signifikanter Unterschied mit einem Wert von 19.6 ± 7.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.009$) erreicht werden. Die maximale Ausprägung an Pseudokanalikuli konnte erst nach 6 h beobachtet werden; zu diesem Zeitpunkt zeigten sich

20.9 ± 4.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (p=0,005). Dies entsprach mehr als einer Verdopplung im Vergleich zum Kontrollwert. Dieser Wert sank nach 8 h auf 17.2 ± 5.6 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (p=0.017). Nach zwei weiteren Stunden besteht ein noch immer signifikanter Unterschied von 14.3 ± 3.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (p=0.008) zum Kontrollwert.

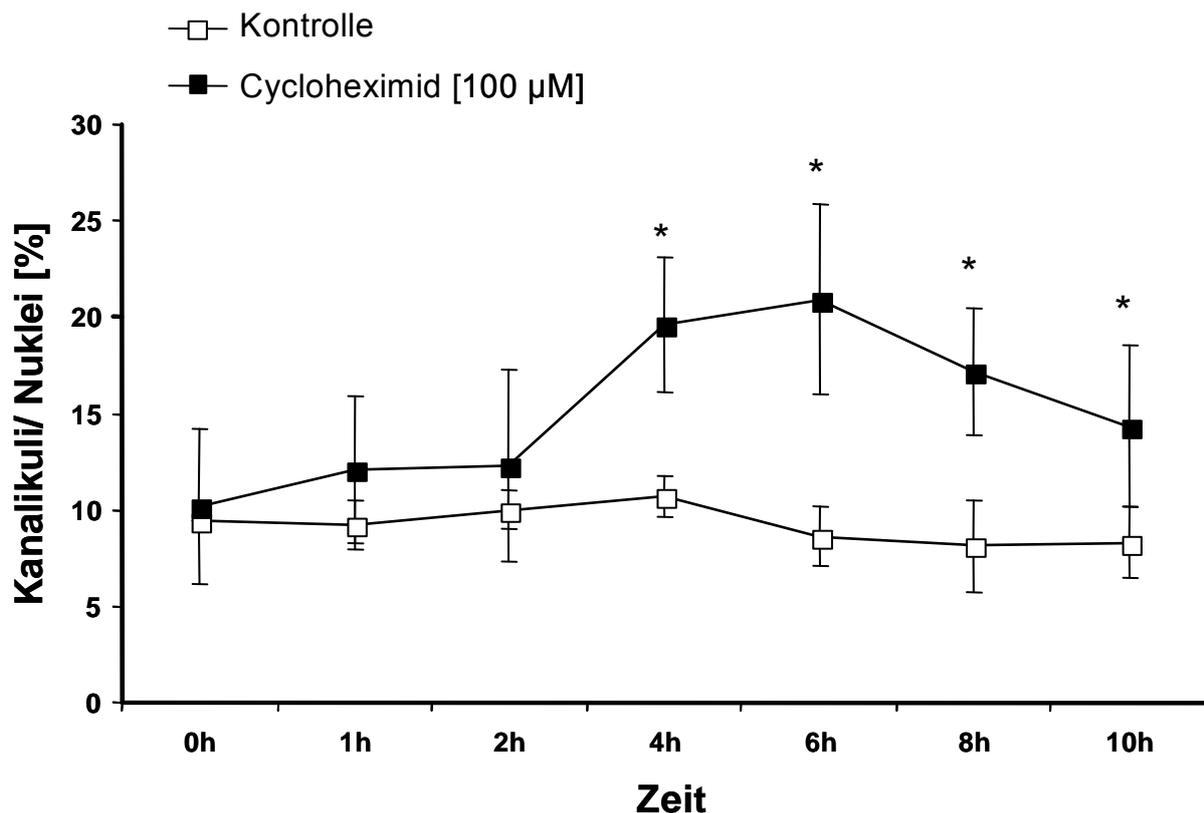


Abb. 11: Zeitabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Cycloheximid in einer Konzentration von 100 µmol/l.

Dargestellt ist die Abhängigkeit der Kanalikuli/Nuklei [%] von der Zeit, bei Applikation von Cycloheximid [100 µmol/l]. Es zeigt sich ein Anstieg der Pseudokanalikuli/100 Zellen, der allerdings erst bei einer Versuchsdauer von 4 h signifikant unterschiedliche Werte aufweist. Das Maximum wird bei 6h erreicht, danach kommt es zu einer Verminderung der beobachteten Pseudokanalikuli/100 Zellen, die jedoch bei zehnstündiger Versuchsdauer noch von der Kontrolle signifikant unterschiedliche Werte besitzt. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten (n=3, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Quadraten, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz p<0.05 als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

4.2.2 Konzentrationsabhängigkeit

Da ein maximaler Effekt der Zunahme der Pseudokanalikuli bei einer Inkubationsdauer zwischen 4 h und 6 h beobachtet worden ist, wurden die weiteren Experimente mit diesen Inkubationszeiten durchgeführt.

Der Kontrollwert zum Zeitpunkt 6 h betrug 9.4 ± 3.0 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Bei einer Konzentration von $0.1 \mu\text{mol/l}$ zeigte sich ein geringer Anstieg auf 12.0 ± 4.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (siehe Abb. 12). Eine Verzehnfachung der Konzentration auf $1 \mu\text{mol/l}$ ergab eine signifikante Steigerung auf 13.6 ± 5.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.018$). Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ wurden 18.6 ± 3.3 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p<0.001$) gefunden.

Eine weitere Zunahme der ausgebildeten Pseudokanalikuli konnte bei einer Konzentration von Cycloheximid von $50 \mu\text{mol/l}$ beobachtet werden. Es zeigten sich unter diesen Versuchsbedingungen 22.1 ± 5.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p<0.001$). Eine Verdopplung dieser Konzentration auf $100 \mu\text{mol/l}$ bewirkte eine Zunahme der Pseudokanalikuli auf 23.5 ± 5.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p<0.001$). Aus der graphischen Darstellung ergibt sich, dass der halbmaximale Effekt von Cycloheximid bezüglich der Induktion der Pseudokanalikuli zwischen $1 \mu\text{mol/l}$ und $10 \mu\text{mol/l}$ erreicht wird.

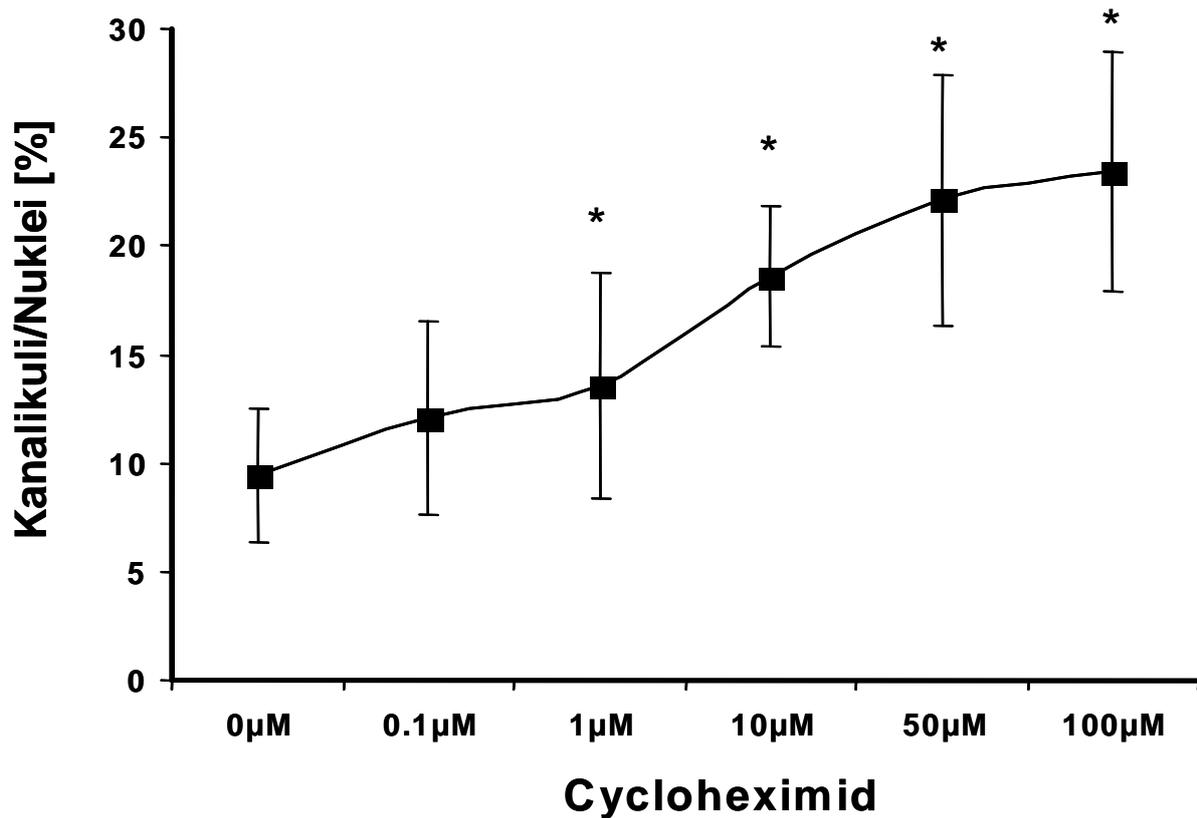


Abb. 12: Konzentrationsabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Cycloheximid

Dargestellt ist die Abhängigkeit der Anzahl der Pseudokanalikuli/100 Nuklei von der Cycloheximidkonzentration. Bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ stellt sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle dar. Erst bei einer Cycloheximidkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zeigt sich eine Signifikanz hinsichtlich der Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Im weiteren Verlauf sieht man bei zunehmender Konzentration einen geringfügigen Anstieg. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Quadraten, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p<0.05$ als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zum Zeitpunkt 0 verschiedenen Versuchsbedingungen.

4.3 Wirkung von Anisomycin auf HepG2-Zellen

Anisomycin ist ebenso wie Cycloheximid ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese. Ferner ist bekannt, dass Anisomycin die MAP-Kinasen p38, ERK, und die c-JNK aktiviert (7,39,64,73,82).

Bei diesem Versuchsdesign zeigte sich bei einem Kontrollwert von 9.2 ± 3.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei nach 4 h eine geringe Zunahme der Ausbildung von Pseudokanalikuli nach Behandlung mit Anisomycin in einer Konzentration von $0.001 \mu\text{mol/l}$ auf 10.7 ± 2.4 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (siehe Abb. 13). Diese Zunahme setzte sich mit steigender Konzentration fort. Allerdings wurde ein signifikanter Unterschied erst bei einer Anisomycinkonzentration von $0.1 \mu\text{mol/l}$ erreicht. Dabei zeigte sich eine Bildung von 14.9 ± 3.4 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.005$). Bei einer Anisomycinkonzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ fanden sich 15.3 ± 3.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.017$). $10 \mu\text{mol/l}$ Anisomycin führte zu einer verminderten Induktion der Pseudokanalikuli auf 12.0 ± 5.6 Pseudokanalikuli/100 Nuklei, gleichzeitig lag keine Signifikanz mehr vor. Nach 6 h ergaben sich bei einem Kontrollwert von 10.2 ± 1.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei bei einer Konzentration von $0.001 \mu\text{mol/l}$ Anisomycin etwa 10.8 ± 3.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Hier führte bereits eine Konzentration von $0.01 \mu\text{mol/l}$ Anisomycin zu einer signifikanten Bildung von 14.0 ± 2.9 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.022$). Anisomycin $0.1 \mu\text{mol/l}$ wies ebenfalls eine signifikante Steigerung der Pseudokanalikuli bis zu einem Wert von 14.8 ± 4.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.001$). Bei höherer Anisomycinkonzentration ließ sich keine signifikante Unterscheidung mehr feststellen.

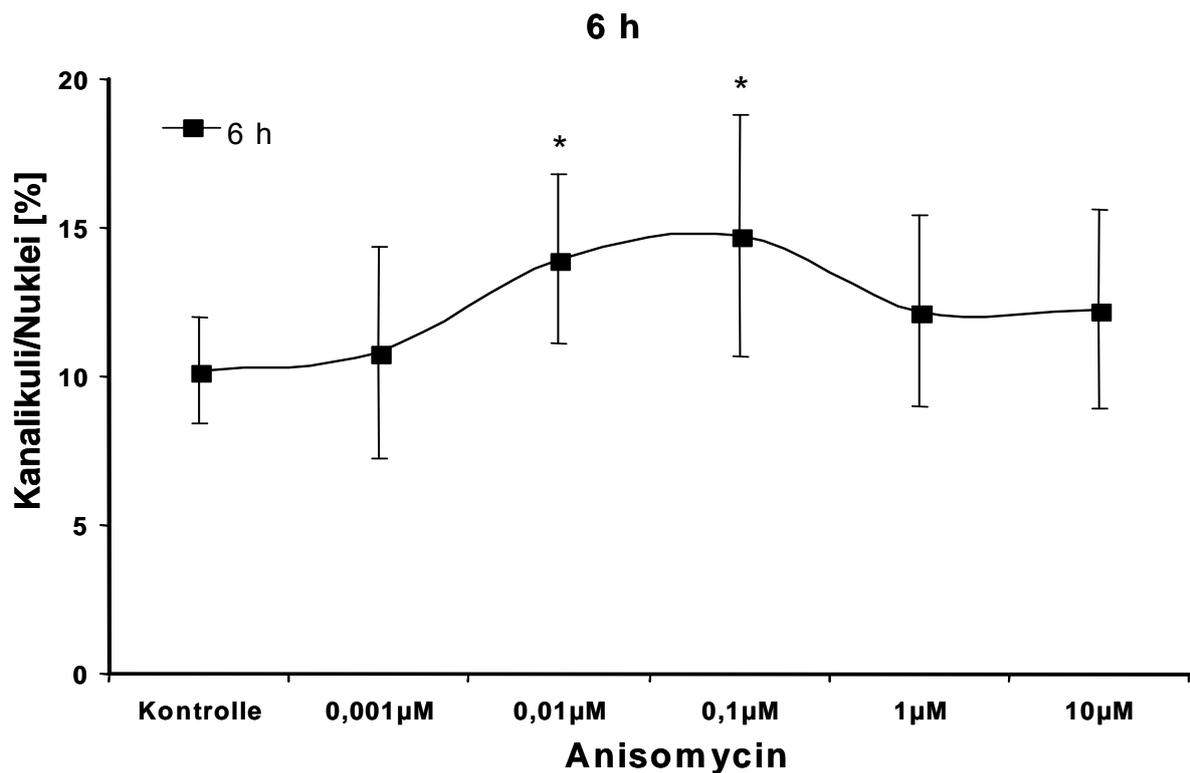
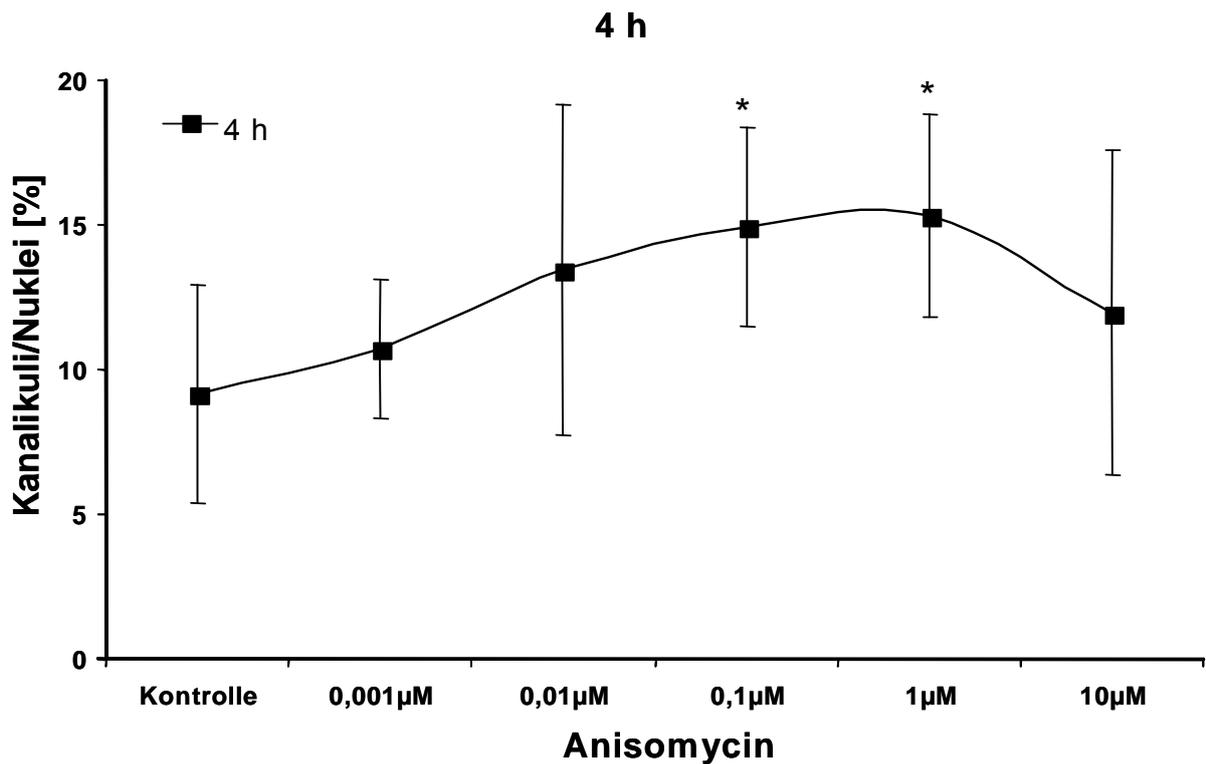


Abb. 13: Zeit und Konzentrationsabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Anisomycin

Diese Graphiken zeigen die Entwicklung der Pseudokanalikuli/100 Zellen in Abhängigkeit von der Anisomycin-Konzentration und der Zeit. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten (n=3, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Quadraten, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p < 0.05$, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Bereich niedriger Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle herrscht. Dieser ist erstmals bei einer Konzentration von 0.01 $\mu\text{mol/l}$ zu beobachten, allerdings erst nach 6 h. Dieser Unterschied setzt sich dann fort bis zu einer Konzentration von 0.1 $\mu\text{mol/l}$ nach 6 h Versuchszeit. Danach fallen die Werte wieder auf ein nicht signifikantes Niveau. Bei einer Versuchsdauer von 4 h setzt ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle erst bei einer Konzentration von 0.1 $\mu\text{mol/l}$ ein. Diese Signifikanz setzt sich im Vergleich aber auch bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ fort, um dann wieder auf nicht signifikante Werte zu fallen.

Es lässt sich also sagen, dass bei Verlängerung der Stimulationsdauer noch mit niedrigeren Konzentrationen ein Effekt ausgelöst werden kann, wohingegen bei höheren Konzentrationen die Stimulationsdauer zur Effektauslösung verkürzt werden muss.

4.4 Beeinflussung der Bildung von Pseudokanalikuli durch den Inhibitor SB 202190 der p38 MAP-Kinase und seinem inaktiven Analogon SB 202474

SB 202190 [500nmol/l]

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 4 h und 6 h untersucht (siehe Abb. 14 und Abb.15). Die Kontrollen bei 4 h wiesen 8.9 ± 3.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei auf, bei 6 h waren es 9.7 ± 3.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. In denen mit Cycloheximid 10 $\mu\text{mol/l}$ behandelten Zellen kam es zu einer gesteigerten Expression der Pseudokanalikuli, nach 4 h waren es 16.8 ± 3.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.007$) und nach 6 h 19.1 ± 7.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.007$). Beide wiesen einen signifikanten Unterschied auf. Durch gleichzeitige Applikation des p38 MAP-Kinasen Inhibitors SB 202190 ließ sich die Cycloheximid abhängige Zunahme der Pseudokanalikuli komplett verhindern. Es fanden sich nach 4 h 8.3 ± 2.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.953$) und nach 6 h 9.5 ± 4.3 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.878$). Diese Werte wiesen keinen

signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf, aber eine signifikante Unterscheidung zu der alleinigen Cycloheximid-Applikation.

Eine alleinige Behandlung mit SB 202190 ergab nach 4 h 8.0 ± 2.4 Pseudokanalikuli/100 Nuklei und nach 6 h 9.6 ± 2.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Dies zeigt, dass der Inhibitor keine intrinsische Aktivität bezüglich der Induktion von Pseudokanalikuli aufweist, denn die beobachteten Werte wiesen keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten auf.

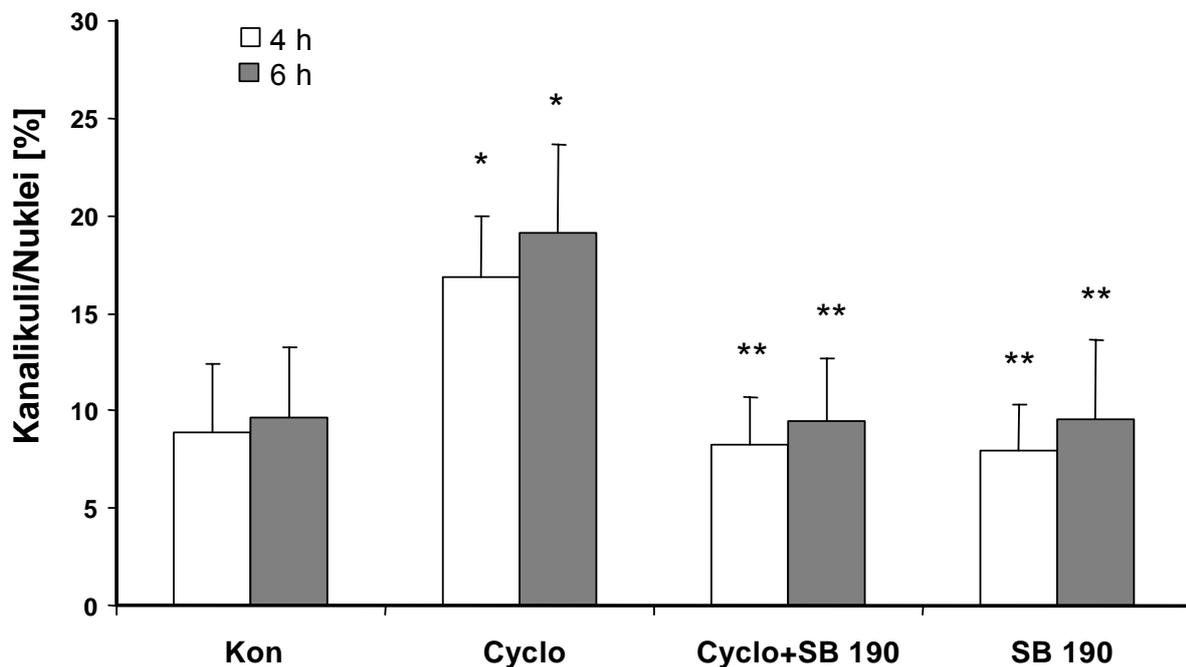


Abb. 14: Cycloheximidhemmung durch p38 MAP-Kinasen Inhibitor SB 202190

Dargestellt ist der Einfluss des Inhibitors der p38 MAP-Kinase SB 202190 [500nmol/l] (SB190) auf den durch Cycloheximid [10 μ mol/l] (Cyclo) vermittelten Effekt. Der Effekt von Cycloheximid lässt sich durch gleichzeitige Zugabe von SB 202190 komplett aufheben. Die alleinige Behandlung mit SB 202190 zeigt keine intrinsische Aktivität. Die oben genannten Effekte lassen sich sowohl bei 4 h als auch bei 6 h beobachten. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten (n=3, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Balken, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p=0.05$, als */ ** dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden.* markiert die signifikant zur Kontrolle mit $p<0.05$ Versuchsbedingung. Und ** markiert die signifikant zur Cycloheximid verschiedenen Versuchsbedingungen mit $p<0.05$.

SB 202474 [500nmol/l]

Diese Versuchsreihe ergab bei oben genannten Zahlen für Kontrollen und für Cycloheximid nach 4 h für Cycloheximid 10 μ mol/l und SB 202474 einen Wert von

16.7 ± 2.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (p=0.05), nach 6 h 19.5 ± 2.7 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (p=0.05) (siehe Abb. 15). Diese Werte weisen eine Signifikanz bezüglich der Kontrolle auf, aber keine zur alleinigen Applikation von Cycloheximid. Demzufolge kann daraus geschlossen werden, dass SB 202474 keinen Einfluss auf den Cycloheximid Effekt hat.

Die mit SB 202474 behandelten Zellen wiesen nach 4 h 11.1 ± 6.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei und nach 6h 10.4 ± 4.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Da hier kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vorliegt, kann wie bereits für SB 202190 erwähnt, genauso die Schlussfolgerung gezogen werden, dass SB 202474 keine intrinsische Aktivität bezüglich der Pseudokanalikuli-Induktion aufweist.

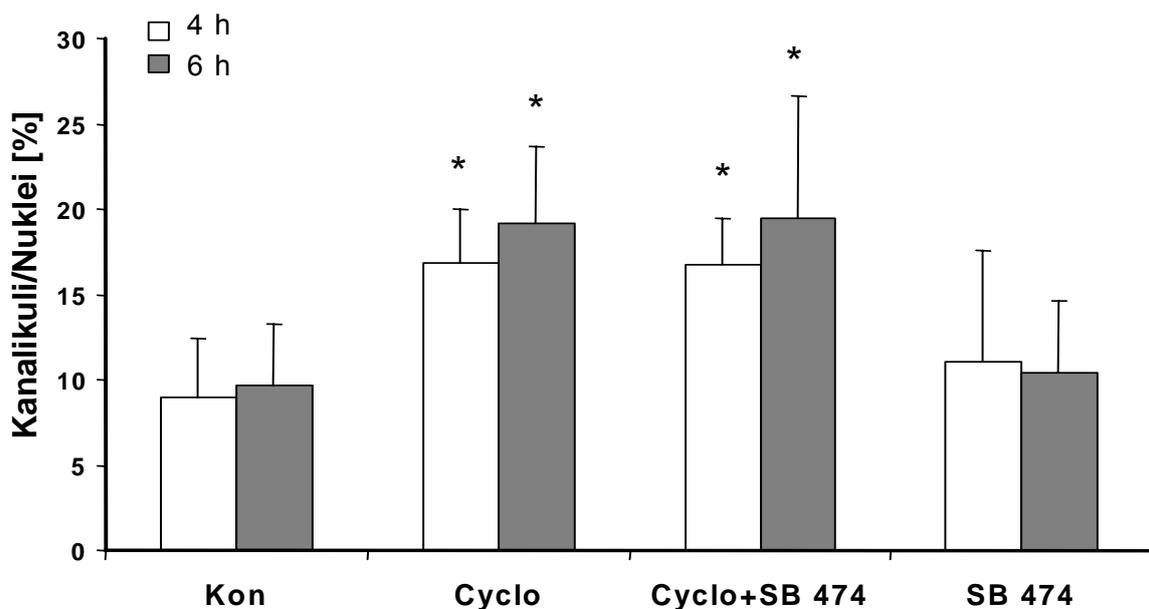


Abb. 15: Cycloheximideffekt in Anwesenheit von SB202474, dem inaktiven Analogon des p38 MAPK Inhibitors SB202190.

Dargestellt ist der Einfluss eines inaktiven Inhibitors der p38 MAP-Kinase, SB 202474 [500nmol/l] (SB 474) auf den durch Cycloheximid [10 µmol/l] (Cyclo) vermittelten Effekt zu verschiedenen Zeitpunkten. Es zeigt sich, dass der durch Cycloheximid vermittelte Effekt bei Zugabe von SB 202474 zu keiner Modifikation des Effekts führte. Die alleinige Applikation von SB 202474 zeigt keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollbedingung. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten (n=3, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Balken, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz p<0.05, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

4.5 Wirkung des MEK 1-Inhibitors PD 098059 auf die Cycloheximid induzierte Zunahme der MRP2-haltigen Pseudokanalikuli

Bei dieser Versuchsanordnung zeigte sich nach 4 h bei einem Kontrollwert von 8.7 ± 3.8 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ein Wert von 14.4 ± 4.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei bei Behandlung mit Cycloheximid ($p=0.005$). Diese Steigerung der gezählten Pseudokanalikuli war somit signifikant verschieden zur Kontrolle.

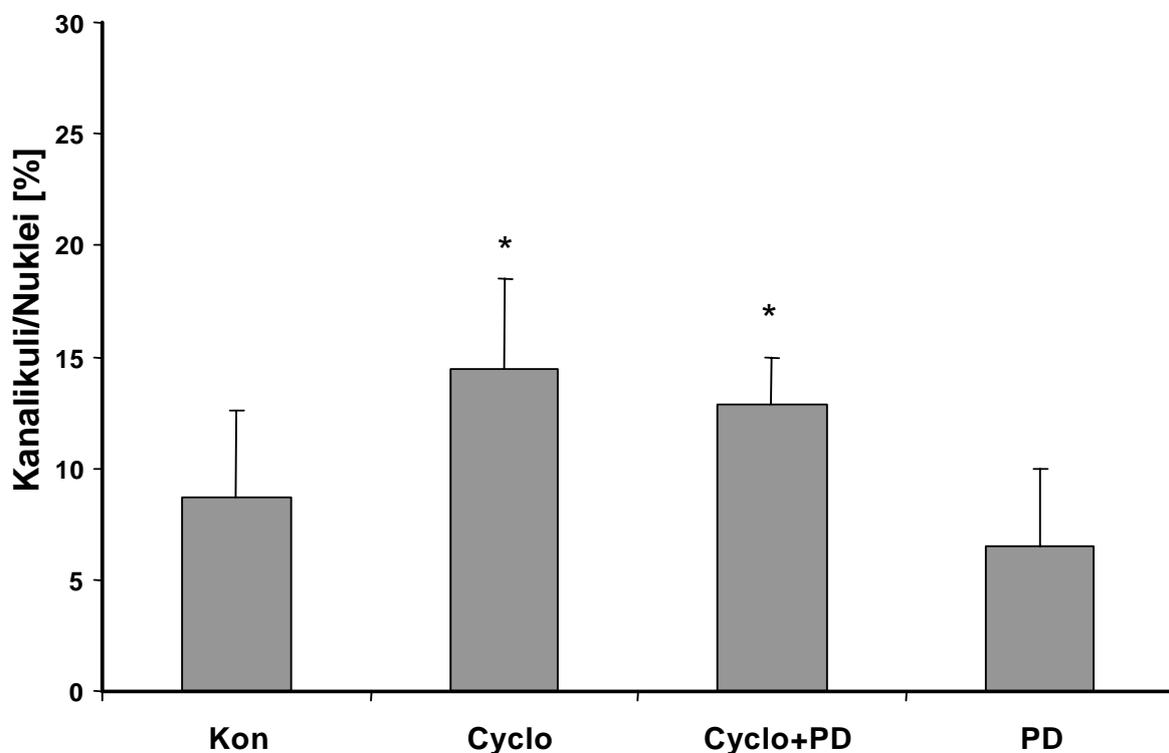


Abb. 16: Cycloheximid und PD 098059

Die Graphik zeigt, dass PD 098059 (PD [5 $\mu\text{mol/l}$]) ein Inhibitor der MEK 1, nach 6 h keinen Effekt auf die durch Cycloheximid (Cyclo [10 $\mu\text{mol/l}$]) vermittelte Steigerung der Pseudokanalikuli/100 Zellen aufweist. PD 098059 führt bei alleiniger Applikation zu leicht erniedrigten Werten gegenüber der Kontrolle (Kon), allerdings ohne signifikanten Unterschied. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Balken, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p<0.05$, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

Wurde gleichzeitig PD 098059, ein Hemmstoff der MEK (*mitogen-activated protein kinase/Erk-kinase*), appliziert, der die Aktivierung der MAP-Kinase vom ERK-Typ

(*extracellular signal regulated kinase*) verhindert (1,76), zeigte sich ein Wert von 12.9 ± 2.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.047$), (siehe Abb. 16). Dies bedeutet, dass eine Inhibition im Signalweg der ERK zu keiner Modulation des Cycloheximid-abhängigen Effekts führt. Bei alleiniger Applikation von PD 098059 kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Abnahme auf 6.5 ± 3.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.93$). PD 098059 übt keinen signifikanten Effekt auf die Lokalisation des MRP2 aus.

4.6 Wirkung des Proteinkinase C-Inhibitors Gö 6850 auf den Cycloheximid vermittelten Effekt

Gö 6850, ein Inhibitor der Ca^{2+} -abhängigen Isoformen der Proteinkinase C (PKC) wie PKC α , PKC β , PKC γ als auch kalziumunabhängiger Isoformen der PKC, wie PKC ϵ und PKC δ (5,53,106) zeigte bei einem Kontrollwert von 9.0 ± 4.3 Pseudokanalikuli/100 Nuklei, etwa 10.5 ± 5.3 Pseudokanalikuli/100 Nuklei (siehe Abb. 17). Diese Differenz wies aber keine statistische Signifikanz in Bezug auf die Kontrollwerte auf. Somit hat auch dieser Inhibitor offensichtlich keine intrinsische Aktivität. Cycloheximid bewirkte nach derselben Versuchszeit einen signifikanten Anstieg auf 18.2 ± 8.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.017$). Wurden Gö 6850 und Cycloheximid gleichzeitig appliziert, so bewirkte dies eine Steigerung im Vergleich zum Kontrollwert auf 15.1 ± 3.0 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.007$). Es zeigte sich allerdings bei vorhandener Signifikanz zur Kontrolle keine signifikante Veränderung zur alleinigen Applikation von Cycloheximid.

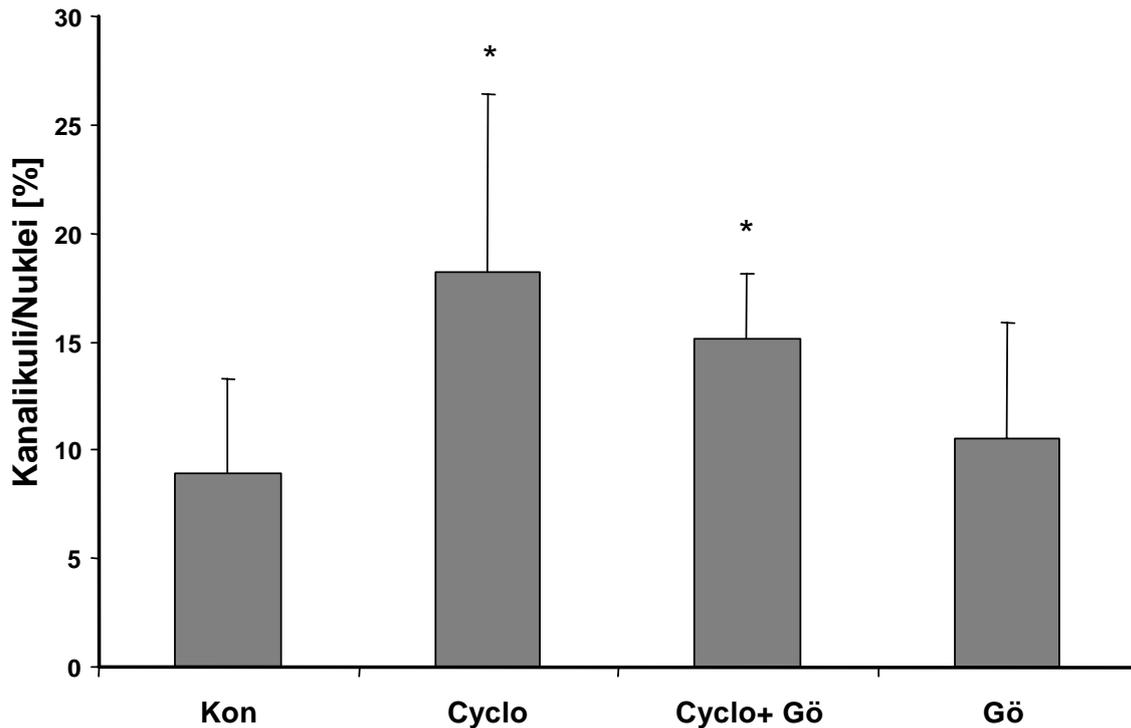


Abb. 17: PKCs sind nicht an der Vermittlung des Cycloheximid- abhängigen MRP2- Targetings beteiligt

Die Darstellung visualisiert den bereits beschriebenen Cycloheximid-Effekt (Cyclo, 10 $\mu\text{mol/l}$). Dieser ist auf eine Beeinflussbarkeit durch einen Inhibitor von PKCs hin untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass der Effekt von Cycloheximid im Vergleich zur Kontrolle (Kon) durch Zugabe von Gö 6850 (Gö) nicht verändert werden konnte. Gö 6850 selbst zeigte keine Pseudokanalikuli-induzierende noch inhibierende Wirkung in Bezug auf die Kontrolle nach 6 h Versuchsdauer. Dies sind Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten (n=3, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Balken, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p < 0.05$, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

4.7 Effekt von Cycloheximid auf die p38 MAP-Kinase

Um den Einfluss von Cycloheximid auf die p38 MAP-Kinase in HepG2-Zellen zu überprüfen, sind Western-Blot Analysen angefertigt worden. Die HepG2-Zellen wurden für die unten angegebenen Zeitintervalle mit Cycloheximid in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ inkubiert.

Die Überstände der lysierten Zellen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Sie wurden mit Antikörpern gegen die phosphorylierte

Form der p38 MAP-Kinase, welche der aktivierten Form entspricht, analysiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die p38 MAP-Kinase, unabhängig von ihrem Phosphorylierungs- bzw. Aktivitätszustand, untersucht. Dabei zeigte sich, dass Cycloheximid innerhalb von 5 Minuten zu einer Zunahme der phosphorylierten Form der p38 MAP-Kinase führte, dass heißt zur Aktivierung der p38 MAP-Kinase. Die Aktivierung war nach 30 Minuten maximal, nahm allerdings im weiteren Verlauf des Versuchs ab. Sie war aber dennoch für den gesamten Versuchszeitraum von 6 h zu beobachten (siehe Abb. 18). Durch den Antikörper, der die p38 MAP-Kinase unabhängig von ihrem Aktivitätszustand darstellt, ist ersichtlich, dass es zu keiner Änderung der Gesamtmenge der p38 MAP-Kinase gekommen ist.

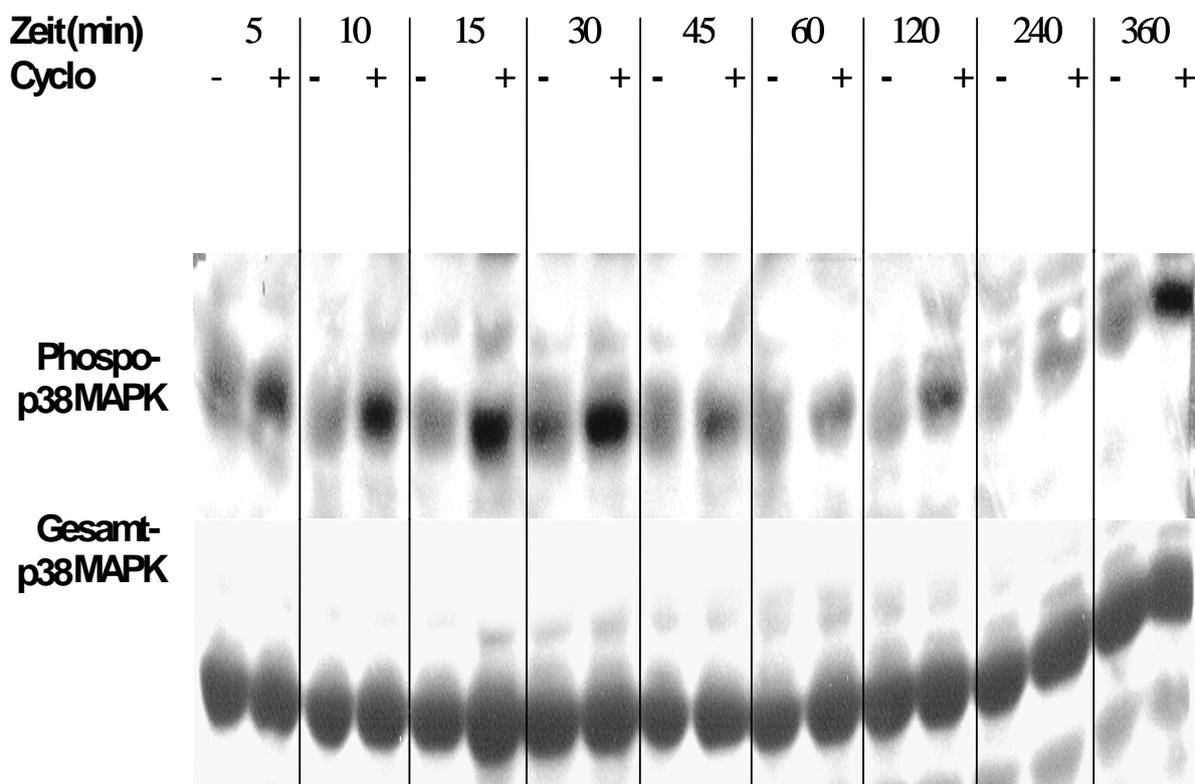


Abb. 18: Einfluss von Cycloheximid auf die p38 MAP-Kinase im Western-Blot

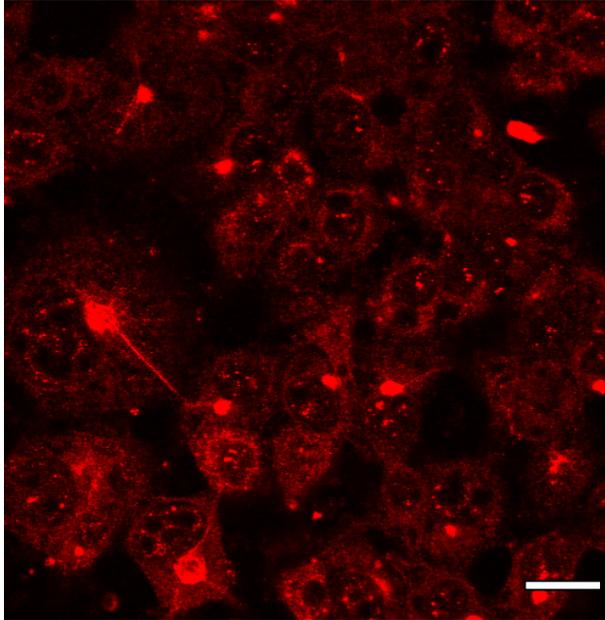
Die HepG2-Zellen sind für die oben genannten Zeiträume mit Cycloheximid (Cyclo) behandelt worden. In der oberen Bande sieht man die Reaktion auf den Antikörper, der die phosphorylierte Form und somit die aktivierte Form der p38 MAP-Kinase (P-p38) darstellt. Es zeigt sich, dass eine Aktivierung bereits nach 5 Minuten stattfindet, die für die gesamte Versuchsdauer von 240 Minuten andauert. Die untere Bande zeigt, dass keine Änderung der Gesamt p38 MAP-Kinase für die gesamte Versuchsdauer zu beobachten ist.

4.8 Transfektion einer konstitutiv aktiven MAP-Kinase-Kinase 6 (MKK6) zur Steigerung der p38 MAP-Kinase Aktivität

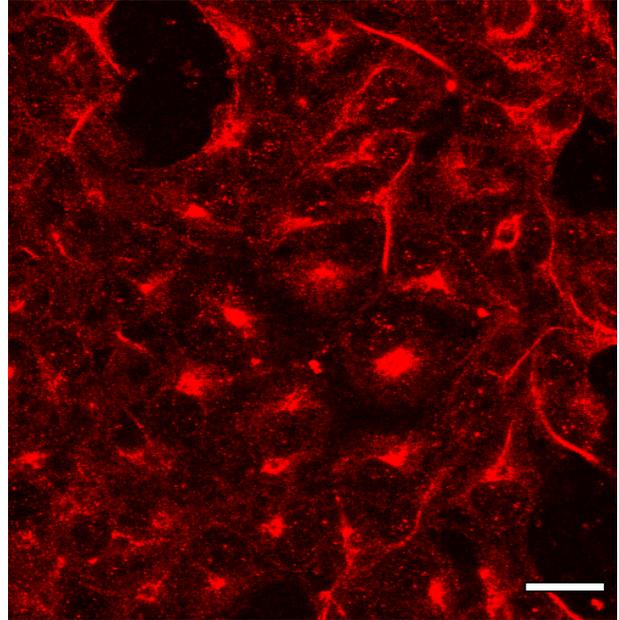
Um die Bedeutung der p38 MAP-Kinase bei der gesteigerten Bildung von Pseudokanalikuli genauer zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches für eine konstitutiv-aktive MKK6 codiert, die ihrerseits die p38 MAP-Kinase aktivieren kann. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pcDNA3 eingesetzt, welches nicht die kodierende DNA-Sequenz für die MKK6 enthielt.

Nach 3 h zeigte sich im Fall von pcDNA3 ein Wert von 10.4 ± 3.6 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Im Fall der MKK6 waren es nach 3 h 13.9 ± 3.0 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.013$). Dies entsprach einer signifikanten Steigerung der Pseudokanalikuli/100 Nuklei von etwa 30 % (siehe Abb. 20). Nach 6 h konnte man 10.2 ± 4.3 Pseudokanalikuli/100 Nuklei als Kontrolle beobachten im Vergleich zu 17.6 ± 6.7 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.009$). Dies entsprach ebenfalls einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollbedingung. Hierbei zeigt sich auch, dass es im zeitlichen Verlauf zu einer zunehmenden Ausbildung der Pseudokanalikuli/100 Nuklei bei den mit MKK6 transfizierten Zellen kommt. Diese Steigerung korrelierte auch mit der lasermikroskopischen Beobachtung einer Zunahme der MKK6-Flag Transfektion, die durch einen Anti-Flag Antikörper detektiert worden ist (Abb. 19). Nach 9 h zählt die Kontrollbedingung 9.9 ± 3.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Die MKK6 wies 11.4 ± 6.0 Pseudokanalikuli/100 Nuklei auf ohne signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf des Versuchs wurden nach 24 h für die Kontrolle 10.3 ± 3.7 Pseudokanalikuli/100 Nuklei und für die MKK6 9.6 ± 4.6 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ausgewertet. Auch hier bestand keine statistische Signifikanz.

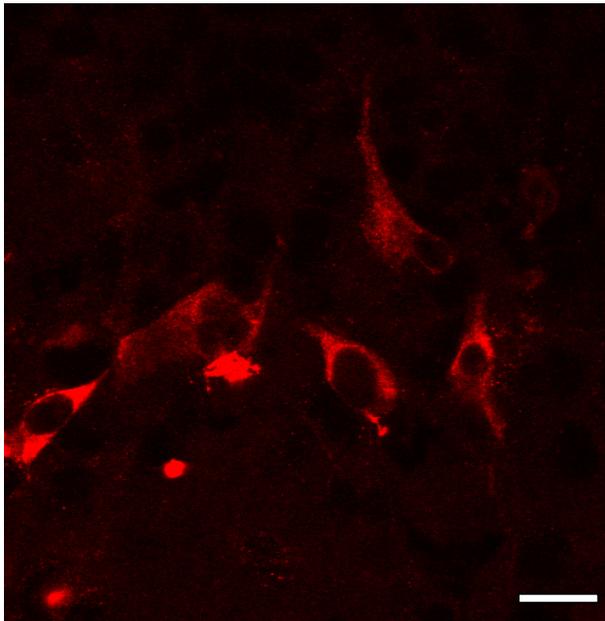
Nach 3 h



Nach 6 h



Nach 12 h



Nach 72 h

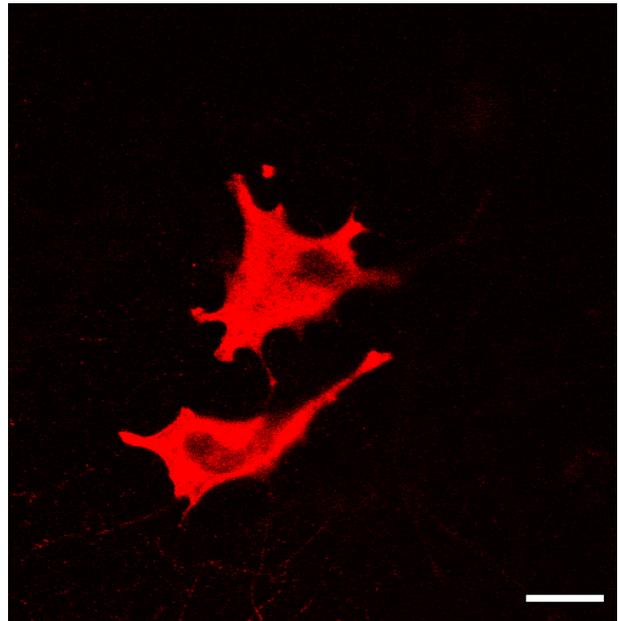


Abb. 19: Fluoreszenzdetektion mit Anti-Flag Antikörper nach Transfektion einer konstitutiv-aktiven MKK6 mit einem Flag-Epitop in HepG2-Zellen

Die Abbildungen zeigen neben den rot dargestellten MRP2 enthaltenden Pseudokanalikuli eine zytosolischen MKK6 Expression, die mit zunehmender Versuchsdauer mehr wird und eine Zellkernaussparung erkennen lässt. Der weiße Balken entspricht 10 μ m.

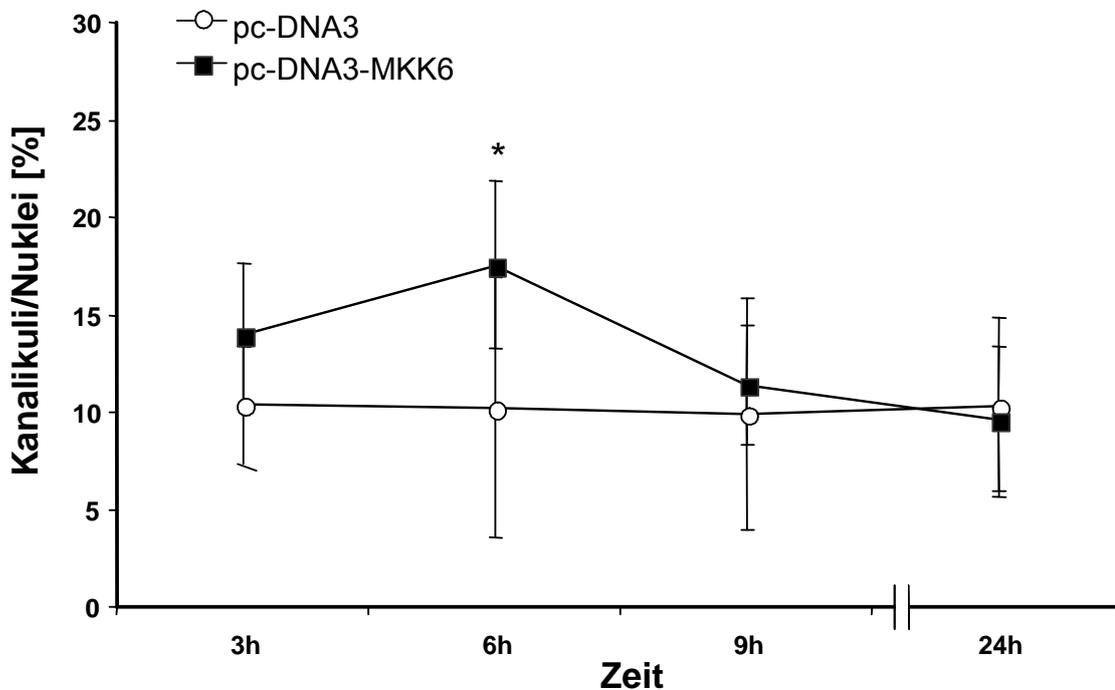


Abb. 20: Zeitabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli nach Transfektion der pcDNA 3-MKK6

Die Graphik zeigt den zeitlichen Verlauf der Pseudokanalikuli-Relation in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Transfektionsbedingungen. Nach 3 h bewirkt die transfizierte MKK6 einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (pcDNA 3) auf. Dieser Unterschied wird nach 6 h noch größer bzw. signifikanter. Allerdings erkennt man nach 9 h eine Verminderung der durch die MKK6 Transfektion induzierten Steigerung der Pseudokanalikuli/100 Zellen auf ein nicht signifikantes Niveau im Vergleich zur Kontrolle. Die MKK6-Transfektion zeigt bis zu einer Versuchsdauer von etwa 72 h keine signifikante Änderung in Bezug auf die Anzahl der Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten (n=3, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Quadraten und Kreisen, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p < 0.05$, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur pcDNA 3 verschiedenen Versuchsbedingungen bei gleicher Versuchsdauer.

4.9 Einfluss von Cytochalasin D auf die Bildung der Pseudokanalikuli in HepG2-Zellen

Mikrofilamente sind ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts. Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes, bindet irreversibel an Mikrofilamente (51). Zur Darstellung der Mikrofilamente wurde daher Phalloidin, welches mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Tritc konjugiert war, eingesetzt. Da bei der üblichen Fixierung der Zellen mit Methanol die Mikrofilamente denaturiert werden und dadurch mittels Phalloidin nicht mehr detektierbar sind, wurde die Fixierungsdauer modifiziert. Es konnte eine optimale Fixierungsdauer von 45 s ermittelt werden (siehe Abb. 21 A).

Wurden die Zellen unterschiedlich lange mit Cytochalasin D, einem Hemmstoff der Mikrofilamente behandelt, so zeigt sich nach 30 min eine beginnende Aufhebung der normalen subplasmalemalen Anordnung der Mikrofilamente (siehe Abb. 21 B).

Nach 4 h war die Anordnung der mikrofilamentären Strukturen komplett aufgehoben (siehe Abb. 21 C).

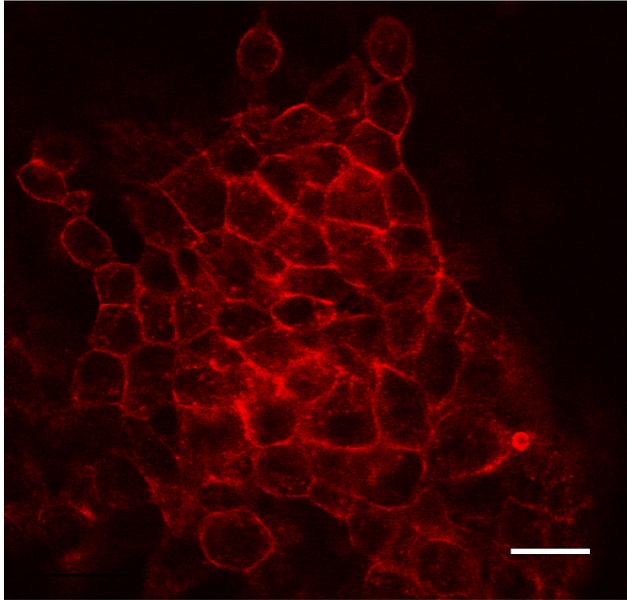
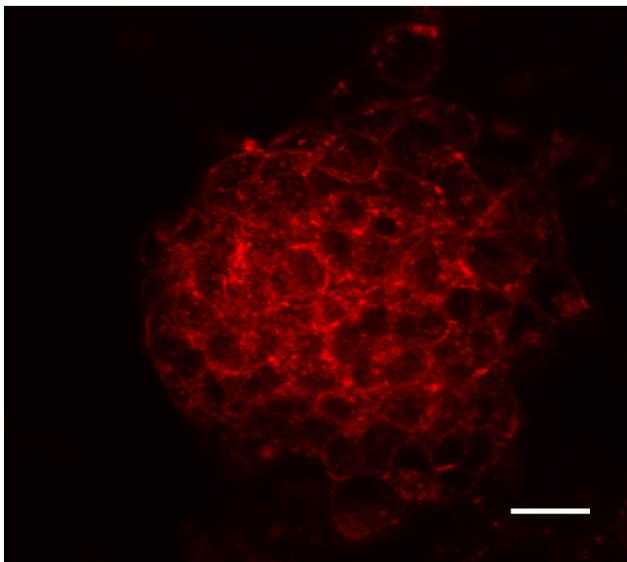
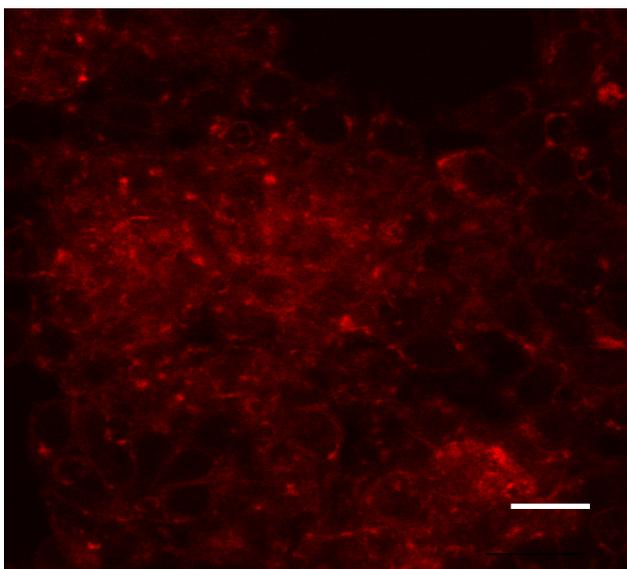


Abb. 21: Einfluss von Cytochalasin D auf das Mikrofilamentsystem der HepG2-Zellen

A) Durch die Fluoreszenzdarstellung mit Tritc-Phalloidin erkennt man deutlich die sub-plasmalemmale Anordnung der Mikrofilamente.



B) Bereits 30 min nach Behandlung mit Cytochalasin D [1 $\mu\text{mol/l}$] zeigt sich eine beginnende Aggregation der Mikrofilamente.



C) Nach 4 h ist die Aggregation der Aktinfilamente soweit fortgeschritten, dass sich die ehemals vorhandene Anordnung nicht mehr nachvollziehen lässt. Die weißen Balken entsprechen 10 μm .

Bezüglich der Ausbildung von Pseudokanalikuli ergab sich bei einem Kontrollwert von 9.8 ± 3.9 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ein Wert von 9.4 ± 2.7 Pseudokanalikuli/100 Nuklei für Cytochalasin D, ohne eine statistische Signifikanz aufzuweisen (siehe Abb. 22). Das heißt Cytochalasin D hatte keinen eigenen Effekt auf die Anzahl der Pseudokanalikuli. Cycloheximid zeigte nach derselben Zeit von 6 h 18.2 ± 3.4 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.007$) und war somit signifikant verschieden zur Kontrolle. Wurden Cytochalasin D und Cycloheximid gemeinsam appliziert, konnte die Cycloheximid abhängige Ausbildung der Pseudokanalikuli komplett inhibiert werden, so dass diese Bedingung mit 10.8 ± 2.6 Pseudokanalikuli/100 Nuklei nach 6 h keine statistische Signifikanz bezüglich der Kontrolle aufwies. Daraus folgt, dass ein intaktes Mikrofilamentsystem Voraussetzung für die Vermittlung des Cycloheximid Effekts ist.

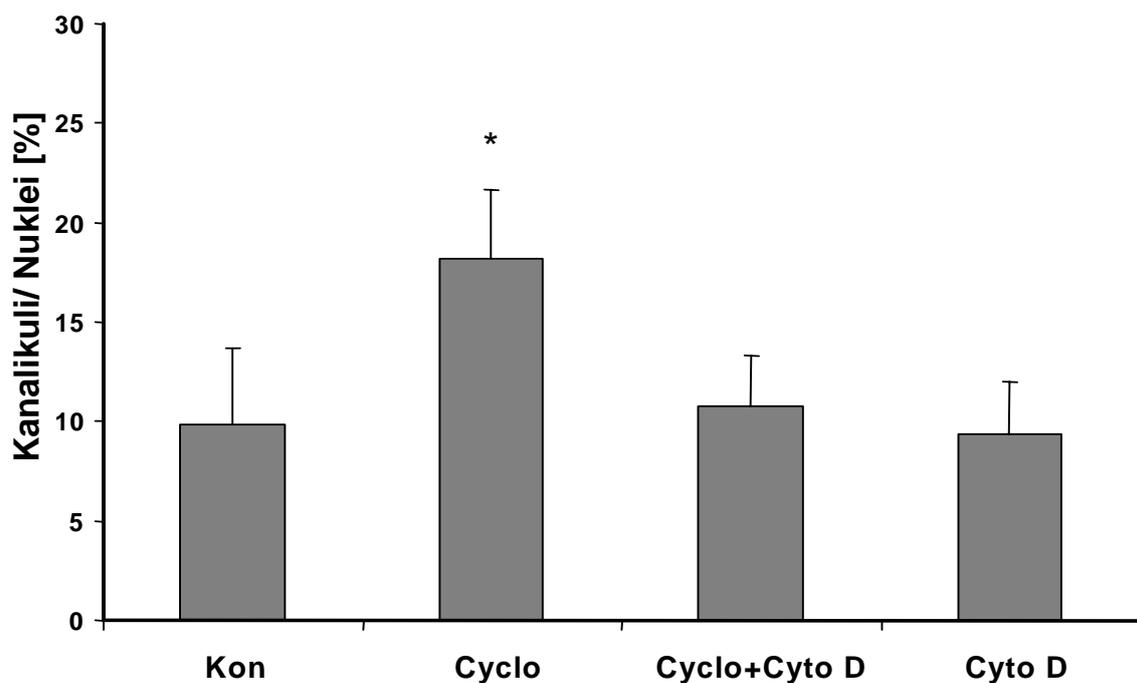


Abb. 22: Hemmung der Cycloheximid-abhängigen Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Cytochalasin D

In dieser Graphik sieht man den Zusammenhang der Hemmwirkung von Cytochalasin D [$1 \mu\text{mol/l}$] (Cyto D), einem Inhibitor der mikrofilamentären Strukturen, und Cycloheximid [$10 \mu\text{mol/l}$] (Cyclo). Bei gleichzeitiger Applikation ist der durch Cycloheximid induzierte Effekt nach einer sechsständigen Versuchsdauer aufgehoben. Cytochalasin D weist gegenüber der Kontrolle (Kon) keine Signifikanz auf. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Balken, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p<0.05$, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

4.10 Einfluss des Mikrotubulus-Hemmstoffs Colchicin auf die Ausbildung von Pseudokanalikuli in HepG2-Zellen

Bei einem Kontrollwert von 11.5 ± 3.7 Pseudokanalikuli/100 Nuklei nach 4 h zeigte sich ein signifikant höherer Wert von 18.3 ± 3.1 Pseudokanalikuli/100 Nuklei bei den mit Cycloheximid behandelten Zellen ($p=0.013$).

Dieser Wert wurde von Cycloheximid in Kombination mit Colchicin nicht mehr erreicht. Stattdessen wurde ein Wert von 11.8 ± 4.3 Pseudokanalikuli/100 Nuklei erreicht, (siehe Abb. 23). Colchicin selber bewirkt eine signifikante Abnahme der Pseudokanalikuli auf 5.5 ± 3.2 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.005$).

Nach 6 h Inkubation mit Cycloheximid fanden sich 19.9 ± 5.5 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.013$) bei einem Kontrollwert von 11.6 ± 2.9 Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Bei Kombination von Cycloheximid mit Colchicin ergab sich mit 10.4 ± 4.4 Pseudokanalikuli/100 Nuklei ($p=0.445$) kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Colchicin alleine führte zu einer signifikanten Abnahme auf 5.4 ± 2.5 Pseudo-kanalikuli/100 Nuklei ($p=0.008$) im Vergleich zur Kontrolle.

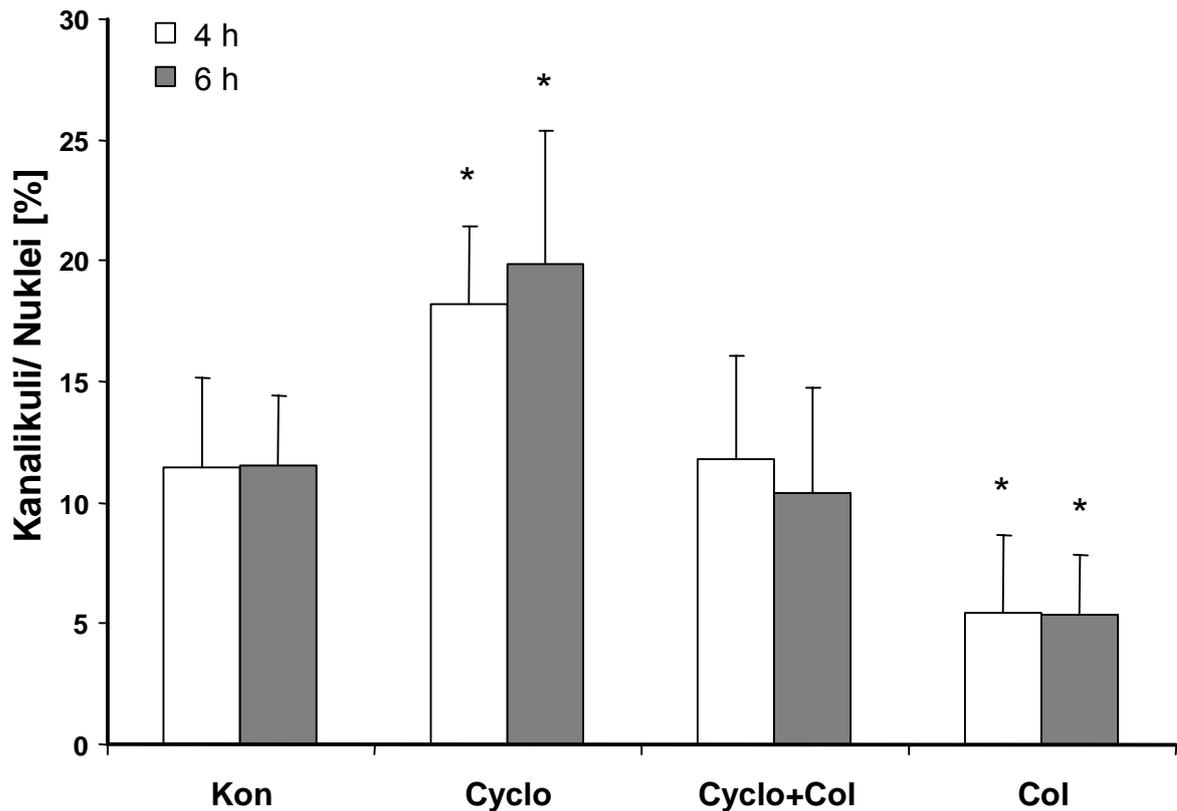


Abb. 23: Abnahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Colchicin

Die Darstellung zeigt die durch Cycloheximid [10 $\mu\text{mol/l}$] (Cyclo) verursachte Steigerung der Pseudokanalikuli/100 Nuklei. Die Zugabe von Colchicin [5 $\mu\text{mol/l}$] (Col) zu Cycloheximid zeigt im Vergleich zur Kontrolle (Kon) keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Pseudokanalikuli, wohl aber zu Cycloheximid. Die alleinige Applikation von Colchicin zeigt sowohl einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zur gleichzeitigen Applikation von Colchicin und Cycloheximid. Diese Befunde treffen sowohl für eine vier- als auch sechsstündige Inkubationsdauer zu. Dies sind repräsentative Ergebnisse einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$, je 10 Gesichtsfelder pro Bedingung). Der Mittelwert entspricht den Balken, die Standardabweichung den Fehlerbalken. Die statistische Signifikanz $p < 0.05$, als * dargestellt, ist mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests berechnet worden. Sie markiert die signifikant zur Kontrolle verschiedenen Versuchsbedingungen.

5. Diskussion

5.1 Einfluss von Cycloheximid auf die Lokalisation von MRP2

Cycloheximid ist ein Inhibitor der Proteinsynthese, der im Bereich der Peptidelongation seine hemmende Wirkung entfaltet (42,165). Ein überraschender Befund dieser Arbeit ist, dass es trotz Hemmung der Proteinsynthese zu einer Zunahme des MRP2 in der kanalikulären Membran der HepG2-Zellen kommt. Bezüglich der Bildung der Pseudokanalikuli wies Cycloheximid einen zeit- und konzentrationsabhängigen Effekt auf. Dabei zeigte sich, dass der maximale Effekt bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde.

Bei einer Cycloheximidkonzentration $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ findet sich eine Zunahme der Pseudokanalikuli/100 Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bis zu einer Versuchsdauer von 6 h. Danach kommt es auch bei hohen Konzentrationen wieder zu einer Verminderung der MRP2 enthaltenden Pseudokanalikuli. Möglicherweise ist der Grund hierfür die Zytotoxizität von Cycloheximid, die durch Hemmung der Transpeptidase bedingt ist (42,44,165). Allerdings wurden in den Versuchsreihen dieser Arbeit gängige Konzentrationen und Versuchzeiten benutzt, so dass andere Möglichkeiten als Ursache für die Transiens des Effektes erwogen werden müssen. Viel wahrscheinlicher handelt es sich bei der relativen Reduktion der Pseudokanalikuli um eine Down-Regulation des vermittelten Effekts, wie es als negatives Feedback bekannt ist. Dieses negative Feedback erfolgt durch eine Terminierung des vermittelten Signals. Im Falle einer Signalvermittlung über die MAP-Kinasen wird dies durch eine Dephosphorylierung durch Protein Phosphatasen erreicht, wie der Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A (PP2A) (vgl. 1.5).

Eine weitere Erklärung für die Down-Regulation könnte sein, dass das MRP2 unter physiologischen Bedingungen einem Gleichgewicht zwischen Einbau in und Ausbau aus der kanalikulären Membran unterliegt (90). Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen kommt es wahrscheinlich initial zu einer Rekrutierung bereits synthetisierter Transportproteine an die kanalikuläre unter dem Einfluss von

Cycloheximid (oder Anisomycin). Ist dieser Pool präexistenter Transportmoleküle aufgebraucht, kann ein Nachschub bzw. Einbau in die kanalikuläre Membran nicht mehr erfolgen und es kommt zu einem Überwiegen des Abbaus. Der fehlende Nachschub führt zu einer Verminderung der MRP2-enthaltenden Pseudokanalikuli im Versuchsverlauf.

Ein weiterer Grund für eine zeitliche Begrenzung des stimulatorischen Effektes von Cycloheximid könnte sein, dass es zu einer Aktivierung von Transportmechanismen kommt, die Cycloheximid aktiv aus den Zellen befördern und somit die Stimulation Cycloheximid-sensitiver Signalwege beendet. MRP2 beispielsweise kann das Chemotherapeutikum Cisplatin aus den Zellen hinaus befördern und somit zur Resistenzbildung gegen diesen Stoff beitragen (23,27). Diese Fähigkeit, Chemotherapeutika aus den Zellen hinaus zu befördern, ist auch für andere ABC-Transporter bekannt (177). Im Falle des Cycloheximids könnte dies ebenfalls ein ABC-Transporter sein.

Diese Arbeit zeigt, dass Cycloheximid nicht nur zu einer bereits beobachteten Steigerung der Genexpression des MRP2 führt (75), sondern dass es auch zu einer Steigerung der MRP2 enthaltenden Pseudokanalikuli kommt. Dabei ist eine gesteigerte MRP2 Genexpression nicht zwangsläufig mit einer Steigerung der MRP2 Protein Präsenz an der kanalikulären Membran verknüpft. Als Beispiel hierfür ist Rifampicin zu nennen. Rifampicin ist einer der potentesten Aktivatoren der MRP2 Expression auf mRNA Ebene (74). Allerdings führt es nicht zu einer gesteigerten Präsenz an der kanalikulären Membran (74). Tamoxifen, ein Anti-Östrogen, ebenfalls als einer der Aktivatoren der MRP2 Expression auf mRNA Level identifiziert, führte hingegen zu einer gesteigerten Präsenz von MRP2 an der kanalikulären Membran (74). Dieser Unterschied zwischen der Wirkung von Rifampicin und Tamoxifen wurde durch einen proteinsyntheseinhibitorischen Effekt des Rifampicins erklärt, der bei Tamoxifen nicht gegeben ist (17). Diese Interpretation müsste mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Hintergrund kritisch überdacht werden, denn diese Arbeit zeigt, dass Hemmung der Proteinbiosynthese eine Zunahme des kanalikulären MRP2 nicht ausschließt. Im Fall des proteinsyntheseinhibitorischen Cycloheximids lässt sich eine Steigerung der MRP2 enthaltenden Pseudokanalikuli an der kanalikulären Membran beobachten. Vielmehr könnte der Grund für eine gesteigerte MRP2 Präsenz an der

kanalikulären Membran durch Tamoxifen im Gegensatz zu Rifampicin darin begründet sein, dass Tamoxifen genauso wie Cycloheximid die Fähigkeit aufweist die p38 MAP-Kinase zu aktivieren (115). Für den Stoff Rifampicin gibt es in der Literatur jedoch keinen Hinweis für eine derartige Interaktion.

5.2 Signalweg des induzierten Targetings

Um zu überprüfen, über welche molekulare Signaltransduktionswege der beobachtete Effekt vermittelt wird, wurden die Zellen mit verschiedenen Stoffen behandelt, deren inhibitorische Effekte auf bestimmte Kinasen bekannt sind.

Eine Blockade der p38 MAP-Kinase durch SB202190 zeigte eine Hemmung des durch Cycloheximid hervorgerufenen Effekts, während das inaktive Analogon SB 202474 den Effekt nicht blockieren konnte. Dies spricht dafür, dass dieser Effekt zumindest zum Teil über die p38 MAP-Kinase reguliert wird. Auf Grund des Inhibitorprofils von SB 202190 kann man darausschließen, dass der beobachtete Effekt über eine Aktivierung der p38 α/β MAP-Kinase vermittelt worden ist. SB 202190 inhibiert speziell nur diese beiden Typen der p38 MAP-Kinase, die zwei übrigen Isoformen (p38 γ/δ MAPK) sind nicht SB 202190 sensitiv (56).

Inwiefern der Pseudokanalikuli induzierende Effekt über andere MAP-Kinasen reguliert wird, ist durch Hemmung der MAP-Kinase-Kinase MEK durch PD 098059 im Signaltransduktionsweg der ERK1/2 MAP-Kinase untersucht worden.

Diese Hemmung zeigte keine Beeinflussung der Steigerung der Pseudokanalikuli-Anzahl in der kanalikulären Membran durch Cycloheximid. Um auszuschließen, dass die Proteinkinase C in der durch Cycloheximid aktivierten Signaltransduktion eine Rolle spielt, ist die Proteinkinase C (PKC) mit einem Hemmstoff, Gö 6850 (siehe 4.6), behandelt worden. Denn von der PKC ist bekannt, dass sie die Translokation des MRP2 aus der kanalikulären Membran in die basolaterale Membran nach PMA Behandlung vermittelt (90).

HepG2-Zellen exprimieren mindestens 4 PKC Isoformen. Dies sind PKC α , PKC β , PKC ϵ und PKC ζ (35, 36, 99). Dabei zeigte sich, dass auch in diesem Fall eine Hemmung dieser Kinase eine Steigerung der Pseudokanalikuli in der kanalikulären

Membran nicht unterbinden konnte. Diese oben genannten Feststellungen tragen zur Untermauerung der Beteiligung der p38 MAP-Kinase an dem durch Cycloheximid vermittelten Effekt bei.

Diese Hypothese sollte zusätzlich gestützt werden durch den Nachweis eines direkten Zusammenhangs zwischen Cycloheximid und der p38 MAP-Kinase. Dazu ist eine Western-Blot Analyse durchgeführt worden. In dieser Analyse zeigte sich nach Zugabe von Cycloheximid bereits nach 5 Minuten ein Aktivitätsnachweis der p38 MAP-Kinase. Diese Befunde stehen auch in Einklang mit einer später veröffentlichten Arbeit, die die p38 MAP-Kinasen Aktivierung durch Cycloheximid in Sammelrohrzellen der Niere nachgewiesen hat (64).

Allerdings wäre es auch möglich, dass Cycloheximid die p38 MAP-Kinase stimuliert und auch zu einem vermehrten Targeting der Pseudokanalikuli zur Zellmembran verantwortlich ist, aber diese Vorgänge unabhängig voneinander sind. Auch der Nachweis, dass der Effekt durch einen spezifischen Inhibitor der p38 MAP-Kinase SB202190 gehemmt wird, kann zwar daran liegen, dass SB 202190 die p38 MAP-Kinase hemmt, es kann aber auch über einen uns unbekanntem Mechanismus zu einer Hemmung des Pseudokanalikuli *Targetings* führen.

Daher musste ein direkter Zusammenhang hergestellt werden, der losgelöst vom Cycloheximid ist.

Dieser Zusammenhang ist durch Transfektion einer MAP-Kinase-Kinase hergestellt worden, der MKK6. Die MKK6 aktiviert alle bisher bekannten Isoformen der p38 MAP-Kinase (134). Damit steht sie im Gegensatz zu anderen MAP-Kinasen-Kinasen, wie der MKK4, die nur den α und δ Typ der p38 MAP-Kinase aktiviert (134). Hier konnte gezeigt werden, dass die Transfektion und somit die Aktivierung der p38 MAP-Kinase zu einer reversiblen Zunahme der Pseudokanalikuli in der kanalikulären Membran führt. Dieser Zustand war für die Dauer von 6 Stunden zu beobachten. Danach zeigten sich wieder normale Werte, welche denen der Kontrolle entsprachen. Dies unterstreicht die Beobachtung, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen unter physiologischen Bedingungen transient ist (134) und durch ein negatives Feedback reguliert wird. Ein Beispiel für ebenso ein negatives Feedback wäre die Regulation der Schilddrüsenhormonausschüttung im menschlichen Organismus.

Die Aktivierung wird durch eine Dephosphorylierung unterbrochen, welche Threonin und Tyrosin innerhalb eines charakteristischen drei Aminosäuren umfassenden Motivs in dem *activation loop* der MAP-Kinase betrifft (190). Das Motiv des *activation loop* besteht aus einer Folge von Threonin einer beliebigen Aminosäure und Tyrosin (190).

Diese Transfektion spricht dafür, dass das durch Cycloheximid hervorgerufene Targeting des MRP2 über die Aktivierung der p38 MAP-Kinase, die ihrerseits diesen Effekt weiter mediiert, zustande kommt.

Dies könnte auch den Signalweg erklären, über welchen die beobachtete Down-Regulation des MRP2 Transporterproteins bei Cholestasezuständen posttranslational reguliert wird (137).

Auf Grund der dualen Wirkung des Cycloheximids, einmal als Proteinsyntheseinhibitor und einmal als Aktivator der p38 MAP-Kinase, müssen auch Ergebnisse von Arbeiten zur Erforschung von Signalwegen, die diesen Stoff als Proteinsyntheseinhibitor verwendet haben, kritisch gewertet werden. Da dieser Stoff selbst Signalkaskaden in Gang setzt, die zelluläre Mechanismen steuern, können die jeweils beobachteten Effekte nicht unbedingt auf den translationshemmenden Effekt von Cycloheximid zurück geführt werden.

Durch einen weiteren Inhibitor der Proteinsynthese Anisomycin, der ebenfalls die Peptidelongation hemmt und auch die Fähigkeit der p38 MAP Kinasen Aktivierung wie Cycloheximid aufweist (7,73,82), ist ein gleichartiger Effekt in Bezug auf das Targeting des Pseudokanalikuli beobachtet worden.

Dabei zeigte sich wie bei Cycloheximid, dass eine Mindestkonzentration des Versuchsstoffes vorliegen muss um ein Resultat zu erzeugen. Es ist aber auch ersichtlich, dass die Konzentration geringer gewählt werden kann, wenn dafür die Einwirkzeit länger ist.

Allerdings wies Anisomycin ab einer gewissen Konzentration kein Pseudokanalikuli induzierenden Effekt mehr auf. Die Ursache dafür ist möglicherweise die bereits in Zusammenhang mit Cycloheximid erwähnte Zytotoxizität. Diese Zytotoxizität ist ebenfalls wie die Steigerung der Pseudokanalikuli sowohl zeitabhängig, als auch konzentrationsabhängig, denn bei einer im Vergleich 50% längeren Versuchszeit

konnte verglichen zur vierstündigen Versuchsanordnung der Effekt höchstens bis zu einer zehnmal niedrigeren Molarität ausgelöst werden.

Eine andere Ursache könnte eine Aktivierung von Transportmechanismen sein, die zu einer Verminderung der intrazellulären Konzentration von Anisomycin und somit auch zu einer Verminderung der MRP2 Induktion führen können.

Ein weiterer Aspekt, den die Aktivierung der p38 MAP-Kinase und das darauf folgende Targeting der Pseudokanalikuli zur Zellmembran aufwirft, ist die Frage, woher diese Transporter stammen?

Eine Neusynthese ist auf Grund der Tatsache, dass Proteinsyntheseinhibitoren verwendet wurden, auszuschliessen. Auch wenn bei den meisten der p38 MAP-Kinase mediierten Effekte eine transkriptionale Beteiligung bisher beschrieben wurde (8). Eine Überlegung ist, ob eventuell ein Pool für MRP2-Transporter in HepG2-Zellen existiert, aus dem diese bei Bedarf rekrutiert werden können. Bei Versuchen mit induzierter Cholestase durch posthepatischen Gallengangverschluss zeigte sich eine deutliche Reduktion des MRP2 Transporterproteins bei unveränderter mRNA Expression. Daraus wurde geschlossen, dass MRP2 wahrscheinlich posttranslational reguliert werden kann (137). Dies wird in dieser Arbeit direkt bewiesen, da bei diesen Versuchen ein Proteinsyntheseinhibitor verwendet worden ist, so dass jede Änderung der Menge des MRP2-Transporterproteins posttranslational erfolgen muss. Das Vorhandensein eines Pools von MRP2-Molekülen wird durch die Beobachtung untermauert, dass MRP2 Proteine in subapikalen Vesikeln nach deren Ausbau lokalisiert sind (siehe Abb. 8 und Abb. 9). Dieser Pool könnte sich zwischen dem Golgi-Apparat und der apikalen Membran befinden, da Colchicin, den Mikrotubuli-abhängigen Transport vom Golgi-Apparat zur apikalen Membran hemmt (siehe 5.3).

Für die kanalikuläre Gallensalzexportpumpe BSEP ist in der perfundierten Rattenleber nachgewiesen worden, dass ein Pool besteht, aus dem dieser Transporter bei Bedarf rekrutiert wird (84,103). Wenn man mit in Betracht zieht, dass neben dem zytoplasmatischen BSEP Pool auch ein Pool im Golgi-Komplex existiert (92) und darüberhinaus in mindestens 15% eine Kolokalisation zwischen BSEP und MRP2 vorliegt, so ist es möglich, dass MRP2 in geringen Mengen auch im Golgi-Apparat lokalisiert ist (33,89,151).

Des Weiteren ist ebenfalls auch eine signifikante Anreicherung eines anderen ABC-Transporters im Golgi-Komplex, im Sinne eines Reservoirs nachgewiesen worden (146). Dabei handelt es sich um den MDR1 Transporter in WIF-B9 Zellen, die ein den HepG2-Zellen ähnliches polarisiertes hepatozytisches Zellwachstum aufweisen. Daher könnte dies auch für den in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transporter zutreffen.

Es ist wahrscheinlich, dass es neben den bereits postulierten Pools von ABC Transportern, die cAMP und Taurocholat sensitiv sind, noch einen weiteren Pool geben kann, der p38 α/β MAP-Kinase sensibel ist. Dieser Pool wäre dann das Reservoir für den MRP2 Transporter (84), aus dem dieser bei Bedarf rekrutiert wird und im Sinne einer Zirkulation zur kanalikulären Membran befördert werden kann (84). Unklar ist noch, ob gemeinsame oder individuelle Pools existieren, aus denen je nach aktivierender Substanz Transporter rekrutierbar sind. Diese intrahepatischen Pools könnten zur Erhöhung der Transportkapazität dienen, wenn eine Sättigung der vorhandenen Transporter unter basaler Kondition vorliegt und eine Steigerung der Exkretionsleistung nur über einen vermehrten Transportereinbau zu bewerkstelligen ist (125,166).

Aus den hier erhobenen Befunden lässt sich nun folgern, dass wegen des Aktivierungsprofils des Cycloheximids in Bezug auf die p38 MAP-Kinase das Targeting über die α und β Isoform reguliert wird. Das Targeting gilt allerdings auf Grund des proteinsynthesinhibitorischen Effekts des Cycloheximids nur für bereits vorhandenes MRP2 und nicht für die de novo Synthese. Der Beweis für das Targeting von neu synthetisiertem MRP2 müsste, wie im Fall des BSEP (103) durch in vivo Experimente erbracht werden. Alternativ könnten auch Stoffe zur Aktivierung der p38 MAP-Kinase gewählt werden, die keinen proteinsyntheseinhibitorischen Effekt besitzen.

Die Regulierbarkeit des MRP2-Targetings durch die p38 MAP-Kinase könnte genutzt werden, um die Wirksamkeit von chemotherapeutischen Substanzen, wie Cisplatin zu steigern. Denn durch eine Hemmung der p38 MAP-Kinase könnte eine Hochregulation zur Steigerung der kanalikulären Präsenz des MRP2 verhindert werden, wie es schon beim SB 202190 gewesen ist. Somit hätte man eine erhöhte

intrazelluläre Konzentration des Chemotherapeutikums und damit eine erhöhte Wirksamkeit.

5.3 Einfluss des Zytoskeletts auf das p38 MAP-Kinase abhängige Targeting der MRP2-haltigen Pseudokanalikuli

Inwiefern der medierte Effekt vom Zytoskelett abhängig ist, ist durch Versuche mit Zytoskeletttoxinen untersucht worden. Dabei wurden das Aktin-Mikrofilamentsystem mit Cytochalasin D und das Mikrotubulussystem mit Colchicin gehemmt (siehe 4.9 und 4.10). Es zeigte sich bei Versuchen mit Colchicin, dass der Effekt des Cycloheximids durch Zugabe von Colchicin komplett antagonisiert wird und keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufweist. Dies führt zu der Annahme, dass das Mikrotubulussystem für den Transport des MRP2 Transporters nötig ist. Allerdings zeigt sich bei alleiniger Applikation des Colchicins ein signifikant niedrigerer Wert bezüglich der Expression von Pseudokanalikuli im Vergleich zur Kontrolle. Diese Verminderung könnte dadurch bedingt sein, dass der Einbau und Ausbau des MRP2 Transporters über zwei unterschiedliche Systeme vermittelt wird, die in einem Gleichgewicht stehen. Der Einbau wird dabei über das Mikrotubulussystem, der Ausbau über ein anderes mikrotubuliunabhängiges System vermittelt. Dies führt dazu, dass die Hemmung der Mikrotubuli eine Hemmung des Einbaus bewirkt, während der Ausbau ungehindert weiterläuft. Es ist aber auch möglich, dass es durch Colchicin zu einer direkten Zerstörung der Pseudokanalikuli kommt.

Cytochalasin D, ein Inhibitor der Mikrofilamente, zeigte bei gleichzeitiger Applikation mit Cycloheximid eine Aufhebung des induzierten Effekts. Daraus ist zu schließen, dass die Aktinstrukturen, die durch das Cytochalasin D zerstört werden, essentiell für das Targeting der MRP2 Transporter sind. Bei solitärer Gabe zeigte sich im Gegensatz zu Colchicin kein intrinsischer Effekt. In diesem Fall scheint kein aktinunabhängiges System bezüglich des *Targetings* der MRP2 Transporter zu existieren.

Wie bereits für den Sphingolipidtransport beschrieben, verhindert eine Depolymerisation der Aktinfilamente, in dieser Studie durch Cytochalasin D hervorgerufen, einen endgültigen Einbau der MRP2 Transporter (40,41,124).

Bei dem Aktinfilament System könnte es sich um das mikrotubuliunabhängige System handeln, das im Fall des Ausfalls des Mikrotubuli System den Transport vermittelt, aber seinerseits nicht durch das Mikrotubuli System bei einem Ausfall ausgeglichen werden kann.

Inwiefern die Motor-Proteine Dynein und Kinesin eine Rolle spielen, könnte insofern beantwortet werden, als dass diese Proteine für ihre Funktion ein intaktes Zytoskelett benötigen, das allerdings bei Applikation der Zytoskeletttoxine nicht mehr gegeben ist. Des Weiteren kann noch ergänzt werden, dass für eine endozytotische Aufnahme von Transportproteinen besonders ein Weitertransport zu den *late*-Endosomen Dynein unerlässlich ist (4,132,133).

Eine zusätzliche Beteiligung der ERM-Familie (*ezrin-radixin-moesin-proteins*), die für eine Verbindung zwischen Aktinfilamenten und integralen Membranproteinen verantwortlich ist, könnte hierbei zusätzlich vorliegen (81). Denn diese ERM Familie ist essentiell für die korrekte Lokalisierung des MRP2 in der kanalikulären Membran (81).

Hypothetisch gesehen könnten die MRP2 Transporter entlang der Mikrotubuli Richtung Zellmembran transportiert werden. Aber um letztlich die Zellmembran zu erreichen, müssen sie mit den mikrofilamentären Strukturen, welche subplasmalemmal verlaufen, interagieren. Diese Interaktion könnte durch die small heat shock Proteine, wie das hsp27, das Mitglied der α -crystallinen Familie der small heat shock Proteine ist und eine regulatorische Funktion bei der Zell und der Aktinkontraktilität besitzt, erreicht werden (167).

Die Aktivierung dieses hsp27 würde durch ein Substrat der p38 α MAP-Kinase der MAPKAP 2, einer Serin/Threonin Proteinkinase mit zytoplasmatischen und nukleären Substraten, induziert werden (167,170,190).

Diese Hypothese könnte die beiden oben genannten Beobachtungen in einen Zusammenhang bringen (siehe Abb. 24).

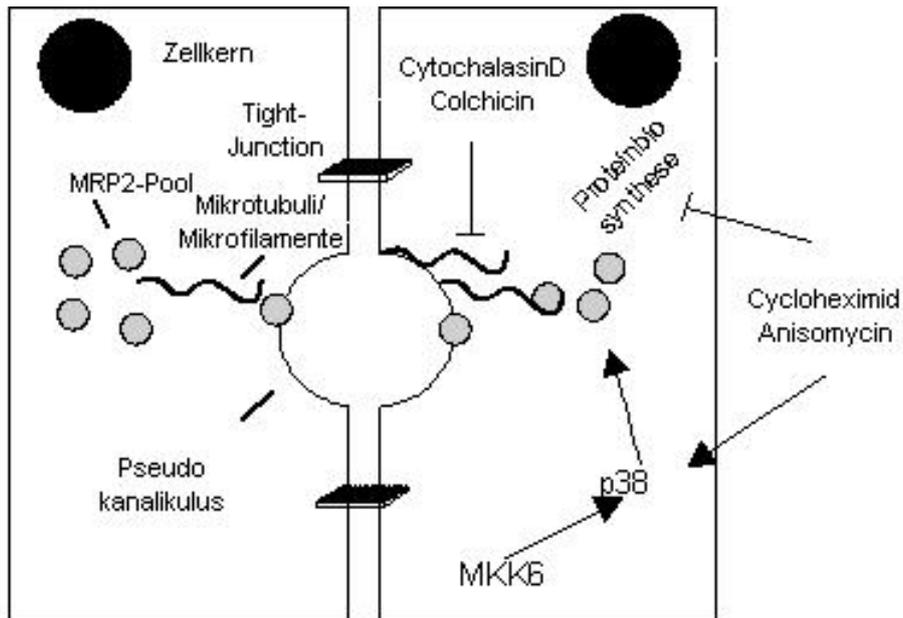


Abb. 24: MRP2- Targeting zur kanalikulären Membran

Diese Graphik gibt die Ergebnisse dieser Arbeit wieder. Es zeigt sich, dass der postrtranslationale Einbau des MRP2 über Aktivierung der p38 MAP-Kinase ermöglicht wird. Die Aktivierung gelingt mit Cycloheximid und Anisomycin. Für den Transport und Einbau in die pseudokanalikuläre Membran sind Mikrofilamente und Mikrotubuli essentiell.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, dass Cycloheximid zu einem vermehrten Einbau des *multidrug resistance associated protein 2* MRP2, das für die kanalikuläre Sekretion von Gluthation und konjugierten Glukuroniden verantwortlich ist, in die kanalikuläre Membran von humanen Hepatomazellen führt.

Dieser Effekt kann durch Inhibition der p38 α / β MAP-Kinase unterbunden werden und ist unabhängig von dem ERK 1/2 und Proteinkinase C Signalweg. In Western-Blot Analysen konnte eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach Zugabe von Cycloheximid gezeigt werden. Dies führte zu der Hypothese, dass der Cycloheximideffekt von der p38 MAP-Kinase mediiert wird. Die Transfektion mit einer konstitutiv aktiven MKK6, die zu einer Aktivierung der p38 MAP-Kinase führt, steigert den Einbau von MRP2 in Pseudokanalikuli und unterstreicht damit die Hypothese.

Cycloheximid führt zu einer Aktivierung der p38 MAP-Kinase und hemmt gleichzeitig die Proteinbiosynthese. Die Steigerung des kanalikulären MRP2 wird also nicht durch Neusynthese, sondern durch vorhandene Beständen erzielt. Daraus lässt sich folgern, dass intrazelluläre MRP2 Pools, die p38 α / β sensibel sind, existieren.

In Bezug auf das Zytoskelett konnte herausgestellt werden, dass MRP2-Targeting hauptsächlich entlang von mikrotubulären Strukturen zu hepatozellulären Membran erreicht wird. Weiterhin zeigte sich, dass ein Mikrotubulus-unabhängiger Transportweg existiert. Dies könnte das für den Einbau essentielle Aktin-filamentsystem sein, denn die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine mikrofilamentäre Beteiligung für den endgültigen Einbau des MRP2 essentiell ist. Demzufolge besteht eine Abhängigkeit des MRP2-Targetings von zytoskelettalen Strukturen.

Zusätzlich sollten auf Grund dieser Arbeit frühere Ergebnisse zur Erforschung von Signalwegen, die sich des Cycloheximids bedienen, welches allerdings auch die p38 α / β MAP-Kinase aktiviert, kritisch hinterfragt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., Saltiel, A. R. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 27489-27494, 1995.
2. Alessi, D. R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, M., Cohen, P. Inactivation of p42 MAP kinase phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr. Biol.* 5: 283-295, 1995.
3. Allikmets, R., Gerard, B., Hutchinson, A., Dean, M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence database. *Hum. Mol. Genet.* 5: 1649-55, 1996.
4. Aviento, F., Emaus, N., Griffiths, G., Gruenberg, J. Cytoplasmic dynein-dependant vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* 123: 1373-1387, 1993.
5. Baccallao, R., Anthony, C., Dotti, C., Kaseruti, E., Stelzer, E. H. K., Simons, K. The subcellular organization of Madin Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J. Cell Biol.* 109: 2817-2832, 1989.
6. Baiocchi, L., Le Sage, G., Glaser, S., Alpini, G. Regulation of cholangiocyte bile secretion. *J. Hepatol.* 31: 179-191, 1999.
7. Barros, L. F., Young, M., Saklatvala, J., Baldwin, S. A. Evidence of two mechanisms for the activation of the glucose transporter GLUT1 by anisomycin: p38 (MAP kinase) activation and protein synthesis inhibition in mammalian cells. *J. Physiol* 504 (Pt 3): 517-525, 1997.
8. Bartles, J. R., Feracci, H. M., Stieger, B., Hubbard, A.L. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using sub cellular fractionation. *J. Cell Biol.* 105: 1241-1251, 1987.
9. Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G. A., Keppler, D., Paumgartner, G., Dombrowski, F. 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, 2001.
10. Beuers, U., Probst, I., Soroka, C., Boyer, J. L., Kullak-Ublick, G. A., Paumgartner, G. Modulation of protein kinase C by tauro lithocholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 29: 477-482, 1999.
 11. Beuers, U., Throckmorton, D. C., Anderson, M. S., Isales, C. M., Thasler, W., Kullak-Ublick, G. A., Sauter, G., Koebe, H. G., Paumgartner, G., Boyer, J. L. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 110: 1553-1563, 1996.
 12. Bode, J. G., Ludwig, S., Correia Freitas, C. A., Schaper, F., Ruhl, M., Melmed, S., Heinrich, P. C., Häussinger, D. The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol. Chem.* 382: 1447-1453, 2001.
 13. Boyer, J. L. Bile duct epithelium: frontiers in transport physiology. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 270: G1-G5, 1996.
 14. Boyer, J. L. Milestone in liver disease: a commentary. *J. Hepatol.* 36: 4-7, 2002.
 15. Boyer, J. L., Nathanson, M. H. Bile formation. In: *Schiff's Diseases of the Liver*, edited by Schiff, E. R., Sorrell, M. F., Maddrey, W.C. New York: Lippincott-Raven: 199-146, 1999.
 16. Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R., Reczek, D. ERM-merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 113-143, 2000.
 17. Buss, W. C., Morgan, R., Gutmann, J., Bareta, T., Slater, K. Rifampicin inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* 200: 432-434, 1978.
 18. Tournier, C., Patricia, H., Derek, D., Yang, J. X., Tod, K. T., Anjaruwee, N., Dafna, B. S., Stephen, N. J., Richard, A. Requirement of JNK for Stress-

- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway. *Science* 288: 870-874, 2000.
19. Cano, E., Mahadevan, L. C. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20: 117-122, 1995.
 20. Cantz, T., Nies, A. T., Brom, M., Hofmann, A. F., Keppler, D. MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278: G522-G531, 2000.
 21. Carlton, V. E., Knisely, A. S., Freimer, N. B. Mapping of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease) to 18q21-q22, the benign recurrent intrahepatic cholestasis region. *Human. Mol. Genet.* 4: 1049-1053, 1995.
 22. Chiu, J. H., Hu, C. P., Lo, S. C., Chang, C. M. The formation of bile canaliculi in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 11(5): 834-842, 1990.
 23. Chu, X. Y., Kato, Y., Sugiyama, Y. Multispecificity of biliary excretion mechanism of irinotecan, CPT 11, and its metabolites in rats. *Cancer Res.* 57: 1934-1938, 1997.
 24. Cole, N. B., Lippincott-Schwartz, J. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 55-64, 1995.
 25. Courtois, A., Payen, L., Guillouzo, A., Fardel, O. Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *FEBS Lett.* 459: 381-385, 1999.
 26. Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., Lee, J. C. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and Interleukin-1. *FEBS Lett.* 364: 229-233, 1995.
 27. Cui Y., Konig, J., Buchholz, J. K., Spring, H., Leier, I., Keppler, D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* 55: 929-937, 1999.

28. Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42: 1007-1017, 2001.
29. Decottignies, A., Goeffeau, A. A complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* 15: 137-45, 1997.
30. Deleuze, J. F., Jacquemin, E., Dubuisson, C., Cresteil, D., Dumont, M., Erlinger, S., Bernard, O., Hadchouel, M. Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 23: 904-908, 1996.
31. Demeule, M., Jodoin, J., Beaulieu, E., Brossard, M., Beliveau, R. Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS Lett.* 442: 208-214, 1999.
32. Doerr, Seifert, Mehlinger. *Pathologie der Leber und Gallenwege.* 2. Aufl. 476-477, 2000.
33. Dombrowski, F., Kubitz, R., Chittattu, A., Wettstein, M., Saha, N., Häussinger, D. Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem. J.* 348: 183-188, 2000.
34. Dubin, I. N., Johnson, F. B. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells: a new clinocopathology entity with a report of 12 cases. *Medicine* 33: 155-172, 1954.
35. Ducher, L., Croquet, F., Gil, S., Davy, J., Feger, J, Brehier, A. Differential expression of five protein kinase C isoenzymes in FAO and HepG2 hepatoma cell lines compared with normal rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 546-553, 1995.
36. Duronio, V., Huber, B. E., Jacobs, S. Partial down-regulation of protein kinase C reverses the growth inhibitory effect of phorbol esters on HepG2 cells. *J. Cell Physiol* 145: 381-389, 1990.
37. Elferink, R. D., Groen, A. K. Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim. et Biophys. Acta* 1586: 129-145, 2002.
38. Elion, E. A. Routing MAP kinase cascades. *Science* 281: 1625-1626, 1998.

39. Enslen, H., Raingeaud, J., Davis, R. J. Selective activation of p38 mitogen activated protein (Map) Kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* 273: 1741-1748, 1998.
40. Fath, K. R., Burgess, D. R. Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cell. *J. Cell Biol.* 126: 661-675, 1994.
41. Fath, K. R., Trimbur, G. M., Burgess, D. R. Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 126: 661-675, 1994.
42. Felicetti, L., Colombo, B., Baglioni, C. Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibiotics. II. The site of action of cycloheximide, streptovitacin A and pactamycin. *Biochim. Biophys. Acta* 119: 120-129, 1966.
43. Fishkind, D. J., Wang, Y. L. New horizons for cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 23-31, 1995.
44. Gant, T. W., Silverman, J. A., Thorgeirsson, S. S. Regulation of P-glycoprotein gene expression in hepatocyte cultures and liver cell lines by a trans-acting transcriptional repressor. *Nucleic Acids Res.* 20:2841-2846, 1992.
45. Gatmaitan, Z. C., Nies, A. T., Arias I. M. Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *Am. J. Physiol.* 272: G1041-G1049, 1997.
46. Gatmaitan, Z. C., Arias, I. M. ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol. Rev.* 75: 261-275, 1995.
47. Goodson, H. V., Valetti, C., Kreis, T. E. Motors and membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 18-28, 1997.
48. Graf, G. A., Yu, L., Li, W. P., Gerard, R., Tuma, P. L., Cohen, J. C., Hobbs, H. H. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J. Biol. Chem.* 278: 48275-48282, 2003.
49. Häussinger, D., Schmitt, M., Weiergraber, O., Kubitz, R. Short-term regulation of canalicular transport. *Semin. Liver Dis.* 20:307-321, 2000.

50. Hagenbuch, B., Meier, P. J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1609: 1-18, 2003.
51. Hale, J. E., Winther, R. E. The mechanism of matrix vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 262: 1916-125, 1987.
52. Hamm-Alvarez, S. F., Alay of, B., Himmel, H., Kim, P. Y., Crews, A. L., Strauss, H. C., Sheetz, M. P. Coordinate depression of bradykinin receptor cycling and microtubule dependant transport by Taxol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7812-7816, 1994.
53. Hamm-Alvarez, S. F., Sheetz, M. P. Microtubule dependent vesicle transport: Modulation of channel and transporter activity in liver and kidney. *Physiol. Rev.* 78: 1109-1129, 1998.
54. Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., Ulevitch, R. J. A Map kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-811, 1994.
55. Han, J., Lee, J. D., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. Endotoxin induces rapid protein tyrosin phosporylation in 70z/3 cells expressing CD 14. *J. Biol. Chem.* 268: 25009-25014, 1998.
56. Hildesheim, J., Awwad, R. T., Fornace, A. J. jr. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. *J. Invest. Dermatol.* 122: 497-502, 2004.
57. Hirokawa, N. Kynesin and Dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279: 519-26, 1998.
58. Hirokawa, N. The mechanism of fast and slow transport in neurons: identification and characterization of the new kinesin super family motors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 605-614. 1997.
59. Hofmann, A. F. Bile acids: The good, the bad and the ugly. *News Physiol. Sci.* 14: 24-29, 1999.

60. Huber, M., Guhlmann, A., Jansen P. L., Keppler, D. Hereditary defect of hepatobiliary cysteinyl leukotriene elimination in mutant rats with defective hepatic anion excretion. *Hepatology* 7: 224-228, 1987.
61. Hyogo, H., Tazuma, S., Nishioka, T., Ochi, H., Yamaguchi, A., Numata, Y., Kanno, K., Sakomoto, M., Asamoto, Y., Tsuboi, K., Nakai, K., Yasumiba, S., Sunami, Y., Kajiyama, G. Phospholipid alterations in hepatocyte membranes and transporter protein changes in cholestatic rat model. *Dig. Dis. Sci.* 46: 2089- 2097, 2001.
62. Janmey, P. Cell membrane and the cytoskeleton. In *Structure and Dynamics of Membranes*. Amsterdam Elsevier : 805-850, 1995.
63. Janmey, P. The cytoskeleton and cell signalling: Component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78: 763-781, 1998.
64. Itani, O. A., Cornish, K. L., Liu, K. L., Thomas, C. P. Cycloheximide increases glucocorticoid-stimulated alpha-ENaC mRNA in collecting duct cells by p38 MAPK-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 284: F778-F787, 2003
65. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Keys, J. R. Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., Young, P. R. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739–746, 1994.
66. Jansen, P. L., Groothuis, G. M., Peters, W. H., Meijer, D. F. Selective hepatobiliary transport defect for organic anions and neutral steroids in mutant rats with hereditary-conjugated hyperbilirubinemia. *Hepatology* 7: 71-76, 1987.
67. Javitt, N. B. HepG2 cells a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol and bile acids. *FASEB J.* 4: 161-168, 1990.
68. Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., Han, J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J. Biol. Chem.* 271:17920-17926, 1996.

69. Johnson, G. L., Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912, 2002.
70. Kajihara, S., Hisatomi, A., Mizuta, T., Hara, T., Ozaki, I., Wada, I., Yamamoto, K. A splice mutation in the human multispecific organic anion transporter gene causes Dubin-Johnson syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 454-457, 1998.
71. Kanno, N., Le Sage, G., Glaser, S., Alpini, G. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281: G612-G625, 2001.
72. Kartenbeck, J., Leuschner, U., Mayer, R., Keppler, D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23: 1061-1066, 1996.
73. Kato, K., Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I. Selective stimulation of Hsp27 and alphaB-crystallin but not Hsp70 expression by p38 MAP kinase activation. *Cell Stress. Chaperones* 4: 94-101, 1999.
74. Kauffmann, H. M., Keppler, D., Gant, T. W., Schrenk, D. Induction of hepatic mrp2 (cMoat) gene expression in nonhuman primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Arch. Toxicol.* 72: 763-768, 1998.
75. Kauffmann, H. M., Keppler, D., Kartenbeck, J., Schrenk, D. Induction of cMRP/cMoat gene expression by cisplatin, 2-acetylaminofluorene, or cycloheximide in rat hepatocytes. *Hepatology* 26: 980-985, 1997.
76. Keitel, V., Burdelski, M., Warskulat, U., Kuhlkamp, T., Keppler, D., Haussinger, D., Kubitz, R. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 41: 1160-72, 2005.
77. Keitel, V., Nies, A. T., Brom, M., Hummel-Eisenbeiss, J., Spring, H., Keppler, D. A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation

- and transport activity of MRP2 (ABCC2). *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 284: G165-174, 2003.
78. Keppler, D., König, J. Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/ cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* 11: 509-516, 1997.
 79. Keppler, D., Arias, I. M. Hepatic canalicular membrane. Introduction: Transport across the hepatocyte canalicular membrane: *FASEB J* 11: 15-18, 1997.
 80. Keyse, S. M. An emerging family of dual specificity Map kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* 1265: 152-160, 1995.
 81. Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of MRP2 from bile canalicular membranes. *Nature Gen.* 31: 320-325, 2002.
 82. Kim, Y. H., Choi, M. R., Song, D. K, Huh, S. O., Jang, C. G., Suh, H. W. Regulation of c-fos gene expression by lipopolysaccharide and cycloheximide in C6 rat glioma cells. *Brain Res.* 872: 227-230, 2002.
 83. Kipp, H., Arias, I. M. Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Semin. Liver Dis.* 20: 339-351, 2000.
 84. Kipp, H., Pichetshote, N., Arias, I. M. Transporters on demand. Intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J. Biol. Chem.* 276: 7218-7224, 2001.
 85. Klein, I., Sarkadi, B., Varadi, A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys.* 1461: 237-262, 1991.
 86. Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209: 497-499, 2003.
 87. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J. van Eijk, M. J., Juju, J. A., Baas, F., Borst, P. Analysis of expression of cMoat (Mrp2), Mrp3, Mrp4 and Mrp5, homologues of the multidrug resistance associated proteine gene (Mrp1) in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 57: 3537-3547, 1997.

88. König, J., Kartenbeck, J., Kron, A., Büchler, M., Brom, M., and Keppler, D. Identification and cloning of the hepatocyte canalicular conjugate export pump deficient in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 24: 131A, 1996.
89. Kubitz, R., D'Urso, D., Keppler, D., Häussinger, D. Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* 113: 1438-1442, 1997.
90. Kubitz, R., Huth, C., Schmitt, M., Horbach, A., Kullak-Ublick, G. A., Häussinger, D. Protein kinase C-dependent distribution of the Multidrug Resistance Protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 34: 340-350, 2001.
91. Kubitz, R., Saha, N., Kühlkamp, T., Dutta, S., vom Dahl, S., Wettstein, M., Häussinger, D. Ca^{2+} -dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 279: 10323-30, 2004.
92. Kubitz, R., Sütfels, G., Kühlkamp, T., Kölling, R., Häussinger, D. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 Map kinase. *Gastroenterology* 126: 541-53, 2004.
93. Kubitz, R., Warskulat, U., Schmitt, M., Häussinger, D. Dexamethasone- and osmolarity-dependent expression of the multidrug-resistance protein 2 in cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* 340: 585-591, 1999.
94. Kubitz, R., Wettstein, M., Warskulat, U., Häussinger, D. Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 116: 401-410, 1999.
95. Kullak-Ublick, G. A., Beuers, U., Paumgartner, G. Hepatobiliary transport. *J. Hepatol.* 32: 3-18, 2000.
96. Kullack-Ublick, G. A., Beuer, U., Fahney, C., Hagenbuch, B., Meier, P. J., Paumgartner, G. Identification and functional characterization of the promotor region of the organic anion transporting polypeptid gene. *Hepatology* 26: 991-997, 1997.
97. Kullak-Ublick, G. A. Regulation of organic anion and drug transporters of the sinusoidal membrane. *J. Hepatol.* 31: 563-573, 1999.

98. Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P. J. Hepatic transport of bile salts. *Semin. Liver Dis.* 20: 273-292, 2000.
99. Kumar, A., Chambers, T. C., Cloud-Heflin, B. A., Mehta, K. D. Phorbol ester-induced low density lipoprotein receptor in HepG2 cells involves protein kinase C-mediated p42/44 MAP kinase activation. *J. Lipid Res.* 38: 2240-2248, 1997.
100. Kumar, S., Mc Donnel, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C, Young, P. R. Novel homologues of CDBP7p38 Map kinase: activation substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 533-538, 1997.
101. Kuntz, E., Kuntz, H. D. *Praktische Hepatologie.* Johann Ambrosius Barth Verlag. 1998.
102. Kurz, A. K., Block, C., Graf, D., vom Dahl, S., Schliess, F., Häussinger, D. Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. *Biochem. J.* 350: 207-213, 2000.
103. Kurz, A. K., Graf, D., Schmitt, M., vom Dahl, S., Häussinger, D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 121: 407-419, 2001.
104. Kyriakis, J. M., Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81: 807-869, 2001.
105. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1987.
106. Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moler, N. P. H., Ulrich, A. Erk6 a mitogen activated protein kinase involved in c2c12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 4355-4359, 1996.
107. Lecureur, V., Courtois, A., Payen, L., Verhent, L., Guillonzo, A., Fardel, O. Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. *Toxicology* 153: 203-219, 2000.

108. Lee, G., Piquette-Miller, M. Influence of IL-6 on MDR and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79: 876-884, 2001.
109. Lee, J. C., Ladydon, J. T., Mc Donell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., Mc Nulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., Mc Laughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., Young P. R. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739-746, 1994.
110. Lee, J. M., Trauner, M., Soroka, C. J., Stieger, B., Meier, P. J., Boyer, J. L. Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 118: 163-172, 2000.
111. Li, Z. J., Jiang, Y., Ulevitch, R. J., Han, J. The primary structure of p38 gamma: A new member of p38 group of Map kinases. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 228:334-340, 1996.
112. Lin, W. W., Hsu, Y. W. Cycloheximide-induced cPLA (2) activation is via the MKP-1 down-regulation and ERK activation. *Cell Signal.* 12: 457-461, 2000.
113. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Darnell, J. *Molekulare Zellbiologie*. De Gruyter Verlag. 2. Auflage, 1996.
114. Ludwig, S., Hoffmeyer, A., Goebeler, M., Kilian, K., Hafner, H., Neufeld, B., Han, J., Rapp, U. R. The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 1917-1922, 1998.
115. Mabuchi, S., Ohmichi, M., Kimura, A., Iiebuchi, Y., Hisamoto, K., Arimoto-Ishida, E., Nishio, Y., Takahashi, K., Tasaki, K., Murata, Y. Tamoxifen inhibits cell proliferation via mitogen-activated protein kinase cascades in human ovarian cancer cell lines in a manner not dependant on the expression of estrogen receptor or the sensitivity to cisplatin. *Endocrinol.* 145: 1302-1313, 2004.
116. Mangeat, P., Christian, R., Martin, M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* 9: 187-192, 1999.

117. Masud, M., Izuka, I., Yamazaki, Y., Nishigaki, M., Kato, Y., Ni'inuma, Y. K., Suzuki, H., Sugiyama, Y. Methothrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res.* 57: 3506-3510, 1997.
118. Meier, P. J., Eckhardt, U., Schroeder, A., Hagenbuch, B., Stieger, B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26: 1667-1677, 1997.
119. Meier, P. J., Stieger, B. Bile salt transporters. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 635-661, 2002.
120. Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., Hirokawa, N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 7004-7011, 2001.
121. Mogilner, A., Osler, G. The physics of lamellopodial protrusion. *Eur. Biophys. J.* 25: 47-53, 1996.
122. Mor-Cohen, R., Zivelin, A., Rosenberg, N., Shani, M., Muallem, S., Seligsohn, U. Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. *J. Biol. Chem.* 276: 36923-36930, 2001.
123. Moore, J. D., Endow S. A. Kinesin proteins: a phylum of motors for microtubule-based motility. *Bioessays* 18: 207-219, 1996.
124. Muallem, S., Kwiatkowska, K., Xu, Y., Yin, H. L. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J. Cell Biol.* 128: 589-598, 1995.
125. Müller, M., Ishikawa, R., Berger, U., Klunemann, C., Lucka, L., Schreyer, A., Ruetter, W., Kurz, G., Keppler, D. ATP dependant transport of taurocholat across the hepatocyte canalicular membrane mediated by 110kDa glycoprotein binding ATP and bile salt. *J. Biol. Chem.* 266: 18920- 18926, 1991.
126. Müller, M., Jansen, P. C. M. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* 272: 1285-1303, 1997.

127. Müller, M., Jansen, P. C. M. The secretory of the liver: New aspects of hepatobiliary transport. *J. Hepatol.* 28: 344-354, 1998.
128. Nathanson, M. H., Boyer, J. L. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14: 551-566, 1991.
129. Nies, A. T., Cantz, T., Brom, M., Leier, I., Keppler, D. Expression of the apical conjugate export pump, Mrp2 in the polarized hepatoma cell line, WiF-B. *Hepatology* 28: 1332-1340, 1998.
130. Noé, B., Schliess, F., Wettstein, M., Heinrich, S., Häussinger, D. Regulation of taurocholate excretion by a hypo-osmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver. *Gastroenterology* 110: 858-865, 1996.
131. Noé J, Hagenbuch, B., Meier, P. J., St Pierre, M. V. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology* 33: 1223-1231, 2001.
132. Novikoff, P. M., Cammer, M., Tao, L., Oda, H., Stockert, R. J., Wolkoff, A. W., Satir, P. Three dimensional organization of rat hepatocyte cytoskeleton relation to the asialoglycoprotein endocytosis pathway. *J. Cell Sci.* 109: 21-32, 1999.
133. Oda, H., Stockert, R. J., Collins, C., Wang, H., Novikoff, P. M., Satir, P., Wolkoff, A. W. Interaction of the microtubule cytoskeleton with endocytotic vesicles and cytoplasmic dynein in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 15242-15249, 1995.
134. Ono, K., Han, J. The p38 signal transduction pathway. Activation and function. *Cell sign.*12: 1-13, 2000.
135. Oude Elferink, R. P., Ottenhoff, R., Liefting, W. G., Schoemaker, B., Groen, A. K., Jansen, P. L. ATP-dependent efflux of GSSG and GS-conjugate from isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol* 258: G699-G706, 1990.
136. Paulusma, C. C., Bosma, P. J., Zaman, G. J. R., Balkler, C. T. M., Otter, M., Scheffer, G. L. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug-resistance associated protein gene. *Science* 271:1126-1128, 1996.

137. Paulusma, C. C., Kothe, M. J., Bakker, C. T., Bosma, P. J., van Bokhoven, I., van Marle, J., Bolder, U., Tytgat, G. N., Oude Elferink, R. P. Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* 31: 684-693, 2000.
138. Paulusma, C. C., Kool, M., Bosma, P. J., Scheffer, G. L., ter Borg, F., Scheper, R. J., Tytgat, G. N., Borst, P., Baas, F., Oude Elferink, R. P. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 25: 1539-1542, 1997.
139. Phillips, M. J., Poucell, S., Oda, M. Mechanisms of cholestasis. *Lab. Invest.* 54: 593-608, 1986.
140. Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., Davis, R. J. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1247-1255, 1996.
141. Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., Davis, R. J. MKK6. *Mol. Cell Bio.* 16: 1247-1255, 2001.
142. Rius, M., Nies, A. T., Hummel-Eisenbeiss, J., Jedlitscky, G. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38: 374-384, 2003.
143. Roelofsen, H., Ottenhoff, R., Oude Elferink, R. P., Jansen, P. L. Hepatocanalicular organic-anion transport is regulated by protein kinase C. *Biochem. J.* 278: 637-641, 1991.
144. Roelofsen, H., Vos, T. A., Schippers, I. J., Kuipers, F., Koning, H., Moshage, H., Jansen, P. L., Muller, M. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology* 112: 511-521, 1997.
145. Rost, D., Kartenbeck, J., Keppler, D. Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* 29: 814-821, 1999.

146. Sai, Y., Nies, A. T., Arias, I. M. Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cell. *Science* 112: 4535-4545, 1999.
147. Schaeffer, H. J., Weber, M. J. Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2435-2444, 1999.
148. Schaub, T. P., Kartenbeck, J., Konig, J., Spring, H., Dorsam, J., Staehler, G., Storkel, S., Thon, W. F., Keppler, D. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1159-1169, 1999.
149. Schiebler, Schmidt, Zilles. *Anatomie*. Springer Verlag, 7. Auflage, 1997.
150. Schliess, F., Kurz, A. K., vom Dahl, S., Häussinger, D. Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 113: 1306-1314, 1997.
151. Schmitt, M., Kubitz, R., Lizun, S., Wettstein, M., Häussinger, D. Regulation of the dynamic localization of the rat BSEP gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 33: 509-518, 2001.
152. Schmitt, M., Kubitz, R., Wettstein, M., vom Dahl, S., Häussinger, D. Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol. Chem.* 381: 487-495, 2000.
153. Schrenk, D., Baus, P. R., Ermel, N., Klein, C., Vorderstemann, B., Kauffmann, H. M. Upregulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol. Lett.* 120: 51-57, 2001.
154. Schroer, T. A. Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 69-73, 1994.
155. Schroer, T. A., Sheetz, M. P. Two activators of microtubule based vesicle transport. *J. Cell Biol.* 115: 1309-1318, 1991.
156. Schroer, T. A., Schnapp, B. J., Reese, T. S., Sheetz, M. P. The role of kinesin and the other soluble factors in organelle movement along microtubules. *J. Cell Biol.* 107: 1785-1792, 1988.

157. Seng, D. H., Lee, D. H., Lee, S. K. Molecular Motor-Proteins of the Kinesin Superfamily Proteins (KIFs'), Structure, Cargo and Disease. *J. Korean Med. Science* 19: 1-7, 2004.
158. Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H., Hirokawa, N. Kinesin superfamily motor-proteins KIF 17 and mLin-10 NMDA receptor containing vesicle transport. *Science* 288: 1796-1802, 2000.
159. Sharp, D. J., Rogers, G. C., Scholey, J. M. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407: 41-47, 2000.
160. Silbernagel, S., Lang, L. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Thieme S.168, 1998.
161. Sormunen, R., Eskelinen, S., Lehto, V. P. Bile canaliculus formation in cultured HepG2 cells. *Exp. Cell Res.* 214: 642-653, 1993.
162. Sperber, I. Secretion of organic anions in the formation of urine and bile. *Pharmacol. Rev.* 11:109-134, 1959.
163. Sprinz, H., Nelson, R. S. Persistent non-hemolytic hyperbilirubinemia associated with lipochrome pigment in liver cells: reports of four cases. *Ann. Int. Med.* 41: 952-961, 1954.
164. Shneider, B. L., Fox, V. L., Schwarz, K. B., Watson, C. L., Ananthanarayanan, M., Thevananther, S., Christie, D. M., Hardikar, W., Setchell, K. D., Mieli-Vergani, G., Suchy, F. J., Mowat, A. P. Hepatic basolateral sodium-dependent-bile acid transporter expression in two unusual cases of hypercholanemia and in extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 25: 1176-1183, 1997.
165. Stanners, C. P. The effect of cycloheximide on polyribosomes from hamster cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22: 758-764, 1966.
166. Stieger, B., O'Neill, B., Meier, P. J. ATP dependant bile salt transport in canalicular rat liver plasma membrane vesicles. *J. Biochem.* 284: 67-74, 1992.
167. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., Gaestel, M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 313: 307-313, 1992.

168. Stossel, T. P. The machinery of cell crawling. *Sci. Am.* 271:54-55, 58-63, 1994.
169. Strautnieks, S. S., Bull, L. N., Knisely, A. S., Kocoshis, S. A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M. S., Kagalwalla, A. F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N. B., Gardiner, R. M., Thompson, R. J. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.* 20: 233-238, 1998.
170. Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Boucke, K., Keller, S., Greber, U. F. Adenovirus activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J.* 20: 1310-1319, 2001.
171. Tang, J., Wong, S., Tranand, P., Janmey, P. Counterion induced bundle formation of rodlike polyelectrolytes. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 100: 796-806, 1996.
172. Tang, J. X., Janmey, P. The polyelectrolyte nature of F-Actin and the mechanism of actin bundle formation. *J. Biol. Chem.* 271: 8556-8563, 1996.
173. Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., Kagotani, K., Okumura, K., Akiyama, S., Kuwano, M. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* 56: 4124-4129, 1996.
174. Tate, G., Li, M., Suzuki, T., Mitsuya, T. A new mutation of the ATP binding cassette, subfamily C, member 2 (ABCC2) in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Genes Genet. Syst.* 77: 117-121, 2002.
175. Toh, S., Wada, M., Uchiumi, T., Inokuchi, A., Makino, Y., Horie, Y., Adachi, Y., Sakisaka, S., Kuwano, M. Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutation in the ATP binding cassette region in Dubin Johnson syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 739-746, 1999.

176. Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C. J., Ananthanarayanan, M., Koeppl, T. A., Schlosser, S. F., Suchy, F. J., Keppler, D., Boyer, J. L. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113: 255-264, 1997.
177. Trauner, M., Boyer J. L. Bile Salt Transporters: Molecular characterization, Function, and Regulation. *Physiol. Rev.* 83: 633-671, 2003.
178. Trauner, M., Meier, P. J., Boyer, J. L. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N. Engl. J. Med.* 339: 1217-1227, 1998.
179. Tsujii, H., König, J., Rost, D., Stockel, B., Leuschner, U., Keppler, D. Exon-intron organization of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 117: 653-660, 1999.
180. Tsukita, S., Yonemur, S. Cortical actin organization: lessons from ERM proteins. *J. Biol. Chem.* 274:34507-34510, 1999.
181. Ujhazy, P., Ortiz, D., Misra, S., Li, S., Moseley, J., Jones, H., Arias, I. M. Familial intrahepatic cholestasis I: studies of localization and function. *Hepatology* 34: 768-775, 2001.
182. Vale, R. D., Fletterick, R. J. The design plan of kinesin motors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 745-777, 1997.
183. Van Kuijck, M. A., Kool, M., Merckx, G. F. M., Geurts van Kessel, A., Bindels, R. J. M., Deen, P. M. T., van Os, C. H. Assignment of the canalicular multispecific organic anion transporter gene (cMOAT) to human chromosome 10q24 and mouse chromosome 19D2 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenic. Cell Genet.* 77: 285-287, 1997.
184. Van Kuijck, M. A., van Aubel, R. A., Busch, A. F., Lang, F., Russel, F. G., Bindels, R. J., van Os, G. H., and Deen, P. M. Molecular cloning and expression of a cyclic AMP-activated chloride conductance regulator a novel ATP-binding cassette transporter. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 93:5401-5406, 1996.
185. Vlahcevic, Z. R., Heumann, D. M., Hylemon, P. B. Physiology and pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. In *Hepatology. A*

- textbook of Liver Disease, edited by Zakim, D., Boyer, T. D. Philadelphia, Pa: Saunders 376-417, 1996.
186. Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y., Kuwano, M. Mutation in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter in patients with hyperbilirubinemia/Dubin-Johnson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 7: 23-207, 1998.
 187. Walter, R. A., Sheetz, M. P. Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 429-451, 1993.
 188. Wang, X. S., Diener, K., Manthey, C. L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C. N., Chan-Hui, P. Y., Mantho, N., Lichenstein, H. S., Zukowski, M., Yao, Z. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 23668-23674, 1997.
 189. Weiß. Basiswissen Medizinische Statistik. Springer Verlag. 2.Auflage, 2001.
 190. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79: 143-180, 1999.
 191. Zanke, B. W., Rubie, E. A., Winett, E., Chan, J., Randall, S., Parsons, M., Boudreau, K., McInnis, M., Yan, M. H., Templeton, D. J., Woodgett, J. R. Mammalian mitogen activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes. *J. Biol. Chem.* 271: 29876-29881, 1996.
 192. Zegers, M. M. P., Zaal, K. J. M., van Ilzendorn, S. C. D., Klappe, K., Hoekstra, D. Actin filaments and microtubules are involved in different membrane traffic pathways that transport Sphingolipids to the apical surface of polarized HepG2 cells. *Mol. Biol. Cell.* 9: 1939-1949, 1998.
 193. Zegers, M. M., Hoekstra, D. Sphingolipid transport to the apical plasma membrane domain in human hepatoma cells is controlled by PKC and PKA activity: A correlation with cell polarity in HepG2 cells. *J. Cell Biol.* 138: 307-321, 1997.

194. Zimniak, P. Dubin-Johnson and Rotor syndromes: molecular basis and pathogenesis. *Semin. Liver Dis.* 13: 248-260, 1993.
195. Zollner, G., Fickert, P., Zenz, R., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Kenner, L., Ferenci, P., Stauber, R. E., Krejs, G. J., Denk, H., Zatloukal, K., Trauner, M. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 33: 633-646, 2000.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Zeichnung einer Leberzelle.....	11
Abb. 2: Schematische Darstellung des MRP2 –Transporters der Ratte mit 1541 Aminosäuren	14
Abb. 3: Signalkaskaden anhand der MAP-Kinasen in Säugetierzellen.....	21
Abb. 4: Strukturformel Cycloheximid. $C_{15}H_{23}NO_4$	26
Abb. 5: Schematischer Versuchsaufbau: Cycloheximid + SB202190/ SB202474	27
Abb. 6: Versuchsanordnung der MKK6-Lipotransfektion	29
Abb. 7: Zellkernfärbung mit DAPI	31
Abb. 8: Immunfluoreszenzdarstellung von MRP2/Villin	37
Abb. 9: Pseudokanalikulus	37
Abb. 10: Zeitabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Cycloheximid in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$	39
Abb. 11: Zeitabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Cycloheximid in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$	40
Abb. 12: Konzentrationsabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudo- kanalikuli durch Cycloheximid	42
Abb. 13: Zeit und Konzentrationsabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Anisomycin	44
Abb. 14: Cycloheximidhemmung durch p38 MAP-Kinasen Inhibitor SB 202190	46
Abb. 15: Cycloheximideffekt in Anwesenheit von SB 202474, dem inaktiven Analogon des p38 MAPK Inhibitors SB 202190.....	47
Abb. 16: Cycloheximid und PD 098059	48
Abb. 17: PKCs sind nicht an der Vermittlung des Cycloheximid- abhängigen MRP2- Targetings beteiligt.....	50
Abb. 18: Einfluss von Cycloheximid auf die p38 MAP-Kinase im Western-Blot.....	51
Abb. 19: Fluoreszenzdetektion mit Anti-Flag Antikörper nach Transfektion einer konstitutiv-aktiven MKK6 mit einem Flag-Epitop in HepG2-Zellen	53

Abb. 20: Zeitabhängige Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli nach Transfektion der pcDNA 3-MKK6	54
Abb. 21: Einfluss von Cytochalasin D auf das Mikrofilamentsystem der HepG2 Zellen.....	56
Abb. 22: Hemmung der Cycloheximid-abhängigen Zunahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Cytochalasin D	57
Abb. 23: Abnahme der relativen Anzahl der Pseudokanalikuli durch Colchicin	59
Abb. 24: MRP2- Targeting zur kanalikulären Membran	69

9. Anhang

Auszüge aus dieser Dissertation wurden auf der 9th United European Gastroenterology Week, Oktober 2001 in Amsterdam im Rahmen des Vortrags "Regulation of the multidrug resistance protein 2 in human HepG2 cells by protein kinase C and p38 MAP kinase", veröffentlicht.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand während meiner Forschungstätigkeit am Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Häussinger, dem ich für diese Möglichkeit danke. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med Ralf Kubitz für die Überlassung des Themas und für die außergewöhnlich gute Betreuung. Vielen Dank auch für die sehr zahlreichen kritischen Diskussionen und die vielen persönlichen Gespräche, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Weiterhin danke ich meinem Vater und insbesondere meiner verstorbenen Mutter für die Möglichkeiten, die sie mir durch ihre Emigration eröffnet haben.

Meiner Schwester Dr. rer. nat. Alia Benali danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Meinem Bruder Dipl. Journ. Mustafa Benali danke ich ebenfalls für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Meinen Schwestern Fatima und Mina danke ich für ihre fortwährende Unterstützung. Besonderen Dank schulde ich meiner Stiefmutter für die finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Zu guter letzt gehört mein erster Dank meiner Frau, die mich immer wieder motiviert hat und mit ihrer uneingeschränkten Liebe und unseren gemeinsamen Kindern mein Leben noch lebenswerter gemacht hat.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Youssef Benali
Geburtsdatum: 16.10.1975
Geburtsort: Wanne-Eickel

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschole an der Ohmstraße, Herne
1986 -1995 Pestalozzi-Gymnasium, Herne

Studium

1996 Humanmedizin an der Heinrich-Heine
Universität Düsseldorf
1998 Physikum
SS 2000 bis WS 2000/01 Forschungssemester in der Abteilung für
Experimentelle Hepatologie (Leitung:
Prof. Dr. med. Häussinger)
Wintersemester 2001 Erwerb des Fachkundenachweises zur
Durchführung von Tierversuchen mit
Groß- und Kleintieren
Oktober 2002 Abschluss Humanmedizin (Note 1.8)

Auslandserfahrung

- Orthopädie San Diego/ USA
- Traumatologie Durban/ Südafrika
- Chirurgie Meknes/ Marokko

Seit März 2003

AiP Klinikum Leverkusen Unfallchirurgie

Seit August 2004

AiW Klinikum Dortmund Unfallchirurgie