

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

**Zur Bedeutung von Phosphatidylinositol-3-Kinasen
für die Modulation hepatobiliärer Sekretion durch Gallensäuren
in der perfundierten Rattenleber**

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

vorgelegt von
Gerald Ulrich Denk

aus
Aichach

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Beuers
Prof. Dr. med. W. Machleidt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. A. Siess
Prof. Dr. med. B. Koletzko

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: ---

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2002

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

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

(Johann B. van Helmont, 1683)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	1
1.1.1	Pathophysiologie und Therapie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten.....	1
1.1.2	Wirkungsmechanismus von UDCA bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten.....	3
1.1.2.1	Protektive Wirkung gegen Schädigung der Gallengänge durch hydrophobe Gallensäuren.....	3
1.1.2.2	Stimulation der hepatozellulären Sekretion von hydrophoben Gallensäuren und anderen potentiellen Hepatotoxinen	3
1.1.3	Wirkungsmechanismus von TLCA.....	5
1.1.4	Phosphatidylinositol-3-Kinasen.....	6
1.1.5	Vesikulärer Transport der Leberzelle.....	8
1.2	FRAGESTELLUNG.....	9
2	METHODIK	10
2.1	VERSUCHSPROTOKOLL	10
2.1.1	Perfusionsprotokoll I	10
2.1.2	Perfusionsprotokoll II	11
2.1.3	Perfusionsprotokoll III	13
2.2	PERFUSION DER ISOLIERTEN RATTENLEBERN	14
2.3	AKTIVITÄT DER HRP IN DER GALLE	16
2.3.1	Theoretische Grundlagen	16
2.3.2	Durchführung der Bestimmung.....	17
2.4	BILIÄRE SEKRETION DES MRP2-SUBSTRATS GS-DNP	18
2.4.1	Theoretische Grundlagen	18
2.4.2	Durchführung der Bestimmung.....	19
2.5	HEPATOVENÖSER EFFLUX DER LDH.....	20
2.6	HEPATOVENÖSER EFFLUX DER GALLENSÄUREN.....	21

2.7	VERTEILUNG DER PKC-ISOFORM ϵ IM LEBERGEWEBE.....	23
2.7.1	Verarbeitung der Lebergewebsproben für den Western-Blot.....	23
2.7.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western-Blotting, Densitometrie	24
2.8	PI ₃ -KINASE-ASSAY AN HEP G2-ZELLEN	25
2.8.1	Transfektion von Hep G2-Zellen mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt..	25
2.8.2	Vorbereitung der Hep G2-Zellen für den PI ₃ -Kinase-Assay.....	26
2.8.3	Immunpräzipitation	27
2.9	MATERIALIEN	29
2.9.1	Wortmannin	29
2.9.2	Bisindolylmaleimid-I-Hydrochlorid.....	30
2.9.3	Chemikalien und Biochemikalien	31
2.10	TIERE.....	32
2.11	STATISTIK.....	32
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	VERSUCHSREIHE I	33
3.1.1	Gallenfluß	33
3.1.1.1	Effekt von Wortmannin.....	33
3.1.1.2	Effekt von TLCA.....	34
3.1.1.3	Effekt von TUDCA.....	36
3.1.1.4	Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA	37
3.1.1.5	Effekt von TCDCA.....	39
3.1.1.6	Modulation des Gallenflusses: Zusammenfassung.....	41
3.1.2	Biliäre Sekretion der HRP.....	42
3.1.2.1	Effekt von Wortmannin.....	42
3.1.2.2	Effekt von TLCA.....	43
3.1.2.3	Effekt von TUDCA.....	45
3.1.2.4	Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA	46
3.1.2.5	Effekt von TCDCA.....	48
3.1.2.6	Modulation der hepatobiliären HRP-Sekretion: Zusammenfassung...	50
3.1.3	Aktivität der LDH.....	51
3.1.4	Verteilung der PKC-Isoform ϵ	53

3.2	VERSUCHSREIHE II	56
3.2.1	Gallenfluß	56
3.2.1.1	Effekt von Wortmannin.....	56
3.2.1.2	Effekt von TLCA.....	57
3.2.1.3	Effekt von TUDCA.....	59
3.2.1.4	Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA	60
3.2.1.5	Effekt von TCDCA.....	61
3.2.1.6	Modulation des Gallenflusses: Zusammenfassung	63
3.2.2	Biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP.....	64
3.2.2.1	Effekt von Wortmannin.....	64
3.2.2.2	Effekt von TLCA.....	65
3.2.2.3	Effekt von TUDCA.....	66
3.2.2.4	Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA	67
3.2.2.5	Effekt von TCDCA.....	68
3.2.2.6	Modulation der biliären GS-DNP-Sekretion: Zusammenfassung	70
3.2.3	Aktivität der LDH.....	71
3.3	VERSUCHSREIHE III	73
3.3.1	Gallenfluß	73
3.3.1.1	Effekt von BIM-I	73
3.3.1.2	Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA	74
3.3.1.3	Modulation des Gallenflusses: Zusammenfassung.....	76
3.3.2	Biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP.....	77
3.3.2.1	Effekt von BIM-I	77
3.3.2.2	Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA	78
3.3.2.3	Modulation der biliären GS-DNP-Sekretion: Zusammenfassung	79
3.3.3	Aktivität der LDH.....	80
3.4	HEPATOVENÖSER EFFLUX DER GALLENSÄUREN.....	82
3.5	AUTORADIOGRAPHISCHER NACHWEIS DER PI ₃ -KINASE-AKTIVITÄT	86
4	DISKUSSION	88
4.1	MODULATION VON GALLENFLUß, HEPATOBILIÄRER EXOZYTOSE, BILIÄRER GS-DNP- SEKRETION UND VERTEILUNG DER PKC-ISOFORM ϵ DURCH GALLENSÄUREN.....	88
4.1.1	Effekt von Wortmannin	91

4.1.2	Effekt von TLCA.....	93
4.1.3	Effekt von TUDCA	95
4.1.4	Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA	96
4.1.5	Effekt von TCDCA	98
4.1.6	Effekt von BIM-I	98
4.2	HEPATOVENÖSE LDH-AKTIVITÄTEN	100
4.3	HEPATOVENÖSER EFFLUX DER GALLENsäUREN.....	102
4.4	PI ₃ -KINASE-ASSAY	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	LITERATURVERZEICHNIS	107
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	123
8	LEBENS LAUF	125
9	DANKSAGUNGEN	126

1 Einleitung

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Pathophysiologie und Therapie chronischer cholestatischer Leberkrankheiten

Cholestase ist eine Einschränkung der Gallensekretion auf der Ebene der Leberzellen oder der Gallengänge. Eine Cholestase wird bei einer Vielzahl hepatobiliärer und systemischer Krankheitsbilder beobachtet. So kann ein cholestatisches Syndrom transient im Rahmen einer entzündlichen systemischen Erkrankung auftreten und bedarf dann keiner spezifischen Intervention. Eine Cholestase kann aber auch Ausdruck einer chronischen cholestatischen Leberkrankheit sein, die unbehandelt progredient verläuft. Die betroffenen Patienten entwickeln eine Leberzirrhose und können im Leberversagen oder an den Komplikationen der Leberzirrhose versterben.

Die häufigsten chronischen cholestatischen Leberkrankheiten im Erwachsenenalter sind die primär biliäre Zirrhose (PBC) und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC). Beiden Krankheiten liegt eine in ihrer Ursache unklare Entzündung der Gallenwege zugrunde. Für die Pathogenese dieser Krankheiten scheint eine Schädigung der Epithelzellen der Gallengänge und der Hepatozyten durch hydrophobe Gallensäuren von Bedeutung zu sein. So verursachen hydrophobe Gallensäuren bei Versuchstieren eine hepatozelluläre Cholestase und Leberschädigung (47, 58, 64), zudem verstärken sie vorbestehende Gallengangsschäden (116). Eine hepatische Retention von hydrophoben Gallensäuren wird daher seit über 35 Jahren als wesentliche Ursache für die progrediente Leberschädigung bei chronischen cholestatischen Krankheiten diskutiert. Damals konnten Holsti und Javitt erstmals zeigen, daß die hydrophobe Lithocholsäure (LCA) und ihr Konjugat Tauroolithocholsäure (TLCA) Cholestase und Zirrhose bei Versuchstieren verursachen (55, 58).

LCA ist die am stärksten cholestatisch wirkende der fünf wichtigsten Gallensäuren des Menschen [LCA, Deoxycholsäure (DCA), Chenodeoxycholsäure (CDCA), Cholsäure (CA), Ursodeoxycholsäure (UDCA)] (53, 58). Die hepatischen Spiegel der beiden hydrophoben Dihydroxygallensäuren CDCA und DCA korrelieren mit dem Grad der Leberschädigung (42, 43, 98). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer gallensäureninduzierten Cholestase und Leberschädigung führen, sind in vielen Aspekten ungeklärt, obwohl in den vergangenen Jahren große Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie der Cholestase erreicht wurden (2, 54, 83, 91).

Konjugate der UDCA schützen bei Versuchstieren, in der isoliert perfundierten Rattenleber und in isolierten Hepatozyten vor Leberschädigung und Cholestase, die von den Konjugaten der CA (63) und von anderen hydrophoben Gallensäuren wie CDCA (40, 47, 48, 64), DCA (47) und LCA (4, 99) verursacht werden. Eine Amidierung der UDCA scheint für ihren protektiven Effekt eine wichtige Voraussetzung zu sein (4, 48, 114). UDCA wurde Patienten mit chronischen cholestatischen Leberkrankheiten wie der PBC erstmals vor etwa 15 Jahren als Medikament unter der Vorstellung verabreicht, daß Veränderungen der Zusammensetzung des endogenen Gallensäuren-pools zugunsten von UDCA einer durch hydrophobe Gallensäuren ausgelösten Leberschädigung entgegenwirken könnten (85).

UDCA stellt derzeit die einzige etablierte Therapie der chronischen cholestatischen Leberkrankheiten dar (14). In randomisierten, placebokontrollierten Studien wurde gezeigt, daß UDCA bei Patienten mit PBC die Serumleberwerte verbessert, die histologische Progression und Zirrhosebildung aufhält, die Komplikationen einer Leberzirrhose vermindert und das transplantationsfreie Überleben verlängert. Nennenswerte Nebenwirkungen der Behandlung wurden nicht berichtet (14). Da die PBC und andere cholestatische Krankheiten progredient und unbehandelt letal verlaufen und oft jüngere Patienten betreffen, kommt einer effektiven Therapie entscheidende Bedeutung zu.

1.1.2 Wirkungsmechanismus von UDCA bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten

Die bisherigen experimentellen Untersuchungen weisen auf zwei hauptsächliche Wirkungsmechanismen von UDCA bei chronischen cholestatischen Leberkrankheiten hin:

1.1.2.1 Protektive Wirkung gegen Schädigung der Gallengänge durch hydrophobe Gallensäuren

Der Mdr2-Knockout-Maus fehlt die Fähigkeit, Phospholipide in die Gallenflüssigkeit zu sezernieren und hierdurch die potentiell membranschädigenden Effekte der hydrophoben Gallensäuren abzupuffern. Daher entwickelt sie eine chronische nichteitriges Cholangitis (103). Bei diesem Modell hemmt die Verabreichung von UDCA die Entwicklung einer chronischen cholestatischen Leberkrankheit. Dies weist auf einen protektiven Effekt der UDCA-Konjugate auf der Ebene der Gallengänge hin (116). *In vitro* haben UDCA-Konjugate einen membranprotektiven Effekt, wenn künstliche oder biologische Membranen millimolaren Konzentrationen von hydrophoben Gallensäuren ausgesetzt werden (44, 48, 49, 50, 69). Die Wirkung der UDCA auf die Bildung und Struktur von einfachen und gemischten Mizellen, wie sie in der Gallenflüssigkeit vorliegen, ist für diese Effekte wahrscheinlich bedeutender als eine direkte Membraninteraktion (51).

1.1.2.2 Stimulation der hepatozellulären Sekretion von hydrophoben Gallensäuren und anderen potentiellen Hepatotoxinen

Die Akkumulation von potentiellen Hepatotoxinen wie hydrophoben Gallensäuren in der Leber scheint eine entscheidende Rolle beim cholestaseassoziierten Leberschaden zu spielen (2, 42, 43, 54, 98).

Die zuerst von Kitani geäußerte Hypothese, daß der zytoprotektive Effekt von UDCA höchstwahrscheinlich über eine Stimulation der Leberzellsekretion vermittelt wird (65), wurde in letzter Zeit experimentell und klinisch untermauert. UDCA-Amide stimulieren bei Patienten mit PBC und PSC die Sekretion von Gallensäuren (59, 107). Vergleichbare Effekte sind am Modell der Gallenfistelratte (47, 64) und bei isolierten Hepatozyten (80) zu beobachten. Damit im Einklang senkt UDCA die Serumspiegel von CDCA bei Patienten mit PBC (87) und von Bilirubin bei Patienten mit PBC und PSC (8, 30, 46, 70, 71, 86). Diese Verbesserung ist klinisch bedeutsam, da der Spiegel des Gesamtbilirubins bei Patienten mit PBC und PSC von hoher prognostischer Aussagekraft ist (29, 36, 37, 93, 101).

Was sind aber die molekularen Grundlagen der stimulierenden Wirkung von UDCA auf die Gallensekretion?

Auf zellulärer Ebene scheint das taurinkonjugierte Derivat von UDCA (TUDCA) die hepatozelluläre Exozytose über Kalzium- und Proteinkinase C (PKC)- α -abhängige Mechanismen zu stimulieren (10, 13) (siehe **Abb. 1**).

Bereits 1993 wurde von Beuers et al. eine Verbesserung der sekretorischen Kapazität von cholestatischen Hepatozyten durch Stimulation der Insertion von Transportproteinen in die kanalikuläre Hepatozytenmembran diskutiert (10). Das Konzept einer durch UDCA stimulierten Insertion von kanalikulären Transportproteinen wurde davon unabhängig auch von anderen Gruppen erörtert (34, 45, 97). Kürzlich konnte erstmals direkt gezeigt werden, daß TUDCA die Insertion des multispezifischen organischen Anionentransporters Mrp2 in die kanalikuläre Hepatozytenmembran bei experimentell induzierter Cholestase bewirkt (17). Das Transportprotein Mrp2 gehört zu den Adenosintriphosphat (ATP)-bindenden Membrantransportern und ist ein Mediator des Effluxes vieler organischer Anionen. Diese umfassen unter anderem Bilirubinglukuronide, Glutathion und Glutathionkonjugate sowie sulfatierte und glukuronidierte Gallensalze (57, 67, 72) und induzieren einen Großteil des gallensäurenunabhängigen Gallenflusses.

Die durch TUDCA induzierte Stimulation der Gallensekretion in der cholestatischen Leberzelle durch gesteigerte Transportproteininsertion in kanalikuläre Membranen

wird möglicherweise über Kalzium- und α -PKC-abhängige Mechanismen vermittelt. TUDCA bewirkt in isolierten Hepatozyten einen anhaltenden Anstieg von freiem zytosolischem Kalzium über eine Entleerung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3)-sensitiven mikrosomalen Kalziumspeichern unabhängig von IP_3 (9, 19) und stimuliert den transmembranösen Kalziumeinstrom über nickelsensitive Kalziumkanäle (9, 10, 19). Zusätzlich kommt es durch TUDCA zu einer selektiven Translokation der kalziumsensitiven α -Isoform der PKC, einem Schlüsselenzym der kalziumstimulierten Exozytose (28), an die hepatozelluläre Membran (11, 20, 108). TUDCA bewirkt einen Anstieg des intrazellulären Diacylglycerols (DAG), eines physiologischen PKC-Aktivators, und aktiviert membrangebundene PKC (13) (siehe **Abb. 1**).

1.1.3 Wirkungsmechanismus von TLCA

TLCA wirkt in niedrigen mikromolaren Konzentrationen stark cholestatisch und leberzellschädigend. Auch diesem ungünstigen Effekt könnten Wechselwirkungen von TLCA mit Signalkaskaden der Leberzelle zugrunde liegen. Gleichsam als Gegenspieler der hydrophilen und protektiven TUDCA induziert die hydrophobe und cholestatisch wirkende Gallensäure TLCA nur einen vorübergehenden Anstieg des hepatozellulären Kalziumspiegels (9, 31, 33) und scheint den Kalziumeinstrom bei höheren mikromolaren Konzentrationen zu behindern (9, 15, 33). TLCA transloziert die kalziumunabhängige ε -Isoform der PKC selektiv in die kanalikuläre Hepatozytenmembran (16) und bewirkt einen Anstieg des hepatozellulären DAG-Spiegels. Ferner aktiviert TLCA die membrangebundene PKC in isolierten Hepatozyten (13, 16). Eine Aktivierung von ε -PKC wurde als Mittler gestörter Insertion von Proteinen in ihre Zielmembran diskutiert. Daher ist ein Zusammenhang zwischen einer Aktivierung der ε -PKC und einer Hemmung der hepatozellulären Sekretion durch TLCA Gegenstand aktueller Diskussionen (16) (siehe **Abb. 1**).

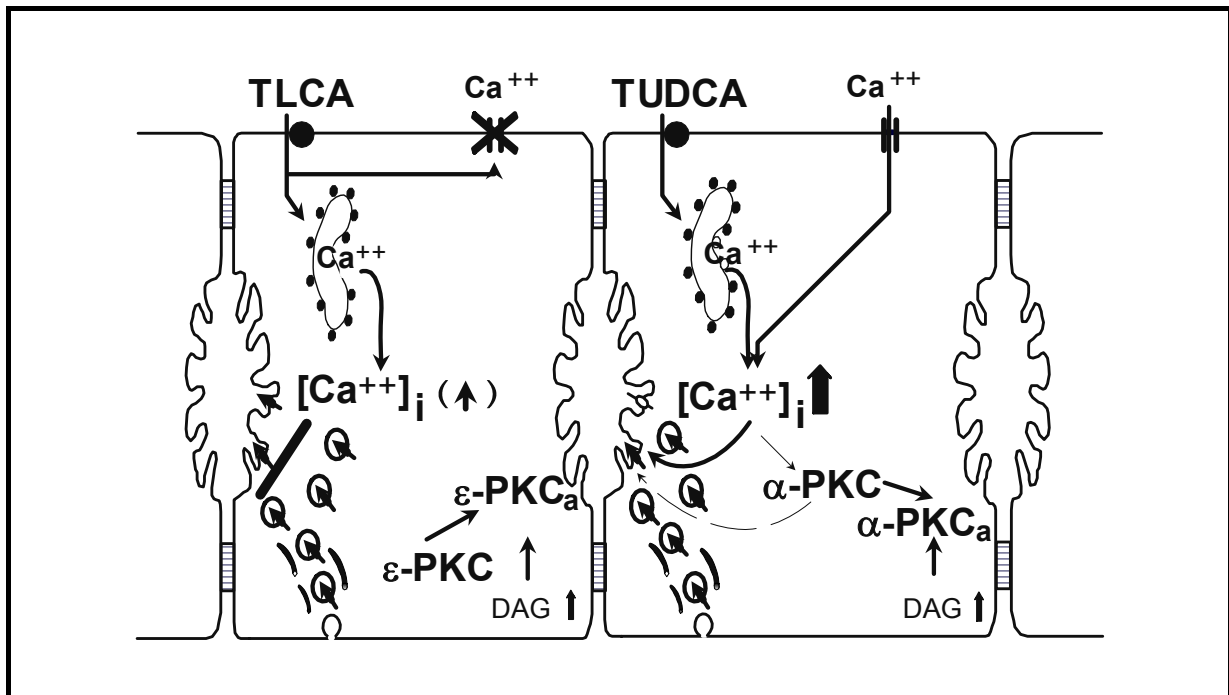


Abb. 1: Modell der durch Gallensäuren induzierten Modulation hepatozellulärer Signalprozesse und Sekretion (modifiziert nach Beuers et al. (9, 10, 11, 13, 15, 16)).

1.1.4 Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI₃-Kinasen)

PI₃-Kinasen sind eine Gruppe von Kinasen, die die Bildung von mindestens drei Phosphoinositiden, Phosphatidylinositol-3-Phosphat, Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat, die Mediatoren bei der Regulation des Wachstums und der Proliferation von Säugetierzellen zu sein scheinen, katalysieren (111). Tyrosinkinase (25) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (106) stimulieren PI₃-Kinasen, die sich in der Zusammensetzung der Untereinheiten unterscheiden. Die von Tyrosinkinase regulierten PI₃-Kinasen sind aus einer katalytischen Untereinheit (110 kDa) und einer regulatorischen Untereinheit (85 kDa) zusammengesetzt (52). Das Klonen der katalytischen Untereinheit zeigte eine interessante Homologie zwischen diesem Protein und dem Hefeprotein VPS34, das eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Proteinverteilung spielt (52, 100).

Es sind zahlreiche Isoformen der PI₃-Kinase bekannt, die in drei Klassen unterteilt werden. PI₃-Kinasen der Klasse I können *in vitro* Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol-4-Phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat als

Substrat verwenden. *In vivo* scheinen sie jedoch Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu bevorzugen. Im Gegensatz dazu setzen PI₃-Kinasen der Klasse II *in vitro* vor allem Phosphatidylinositol um. Ihre Affinität gegenüber Phosphatidylinositol-4-Phosphat und besonders Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ist deutlich geringer. Welche Phosphoinositide von den Klasse II-PI₃-Kinasen *in vivo* phosphoryliert werden, ist bislang noch ungeklärt. Die PI₃-Kinasen der Klasse III können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nur Phosphatidylinositol als Substrat verwenden. Sie scheinen für die Bildung eines Großteils des Phosphatidylinositol-3-Phosphats in der Zelle verantwortlich zu sein (115).

Einige Studien, die spezifische PI₃-Kinase-Inhibitoren (Wortmannin, LY 294002) verwendeten, und Mutagenesestudien des Rezeptors für den Thrombozytenwachstumsfaktor PDGF, eines potenten PI₃-Kinase-Aktivators, *in vitro* zeigten die wichtige Rolle von PI₃-Kinasen für den transzellulären Vesikeltransport und für die Anordnung der für Sekretionsprozesse verantwortlichen Zytoskelettstrukturen (27, 60, 81).

Gallensäuren scheinen einen modulierenden Effekt auf die PI₃-Kinase-Aktivität in Leberzellen zu haben. 1998 konnten Misra et al. an isoliert perfundierten Rattenlebern zeigen, daß die leicht choloretisch wirkende Gallensäure Taurocholsäure (TCA) in niedrigen mikromolaren Konzentrationen über PI₃-Kinase-abhängige Mechanismen zu einer Steigerung der Gallensäuresekretion führt (76). Ein Jahr später wurde von der gleichen Gruppe berichtet, daß die kanalikulären Transportproteine Bsep und Mrp2 von Produkten der PI₃-Kinasen reguliert werden (77). Kurz et al. wiesen kürzlich in kultivierten Hepatozyten eine zeit- und konzentrationsabhängige PI₃-Kinase-Aktivierung durch TUDCA nach. In der gleichen Veröffentlichung wurde eine potentielle Aufhebung der stimulierenden Wirkung von TUDCA auf die Gallensäuresekretion in der perfundierten Rattenleber beschrieben, wenn der PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin verabreicht wurde (68). Rust et al. beobachteten kürzlich signifikant erhöhte PI₃-Kinase-Aktivitäten in einer Leberzelllinie, die mit der hydrophoben Gallensäure Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) inkubiert war (95).

PI₃-Kinasen modulieren die Aktivität einer Vielzahl von für zelluläre Transportprozesse wichtigen Kinasen (115). Auch der Einfluß von PI₃-Kinasen auf die Isoformen der PKC wurde untersucht. In mit Baculovirus infizierten Insektenzellen konnte beobachtet werden, daß die PI₃-Kinase-Produkte Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat die PKC-Isoform ϵ aktivieren (110). In Hep G2-Zellen führte die Aktivierung einer Mutante des Rezeptors für PDGF, die PI₃-Kinasen aktiviert, zu einer Translokation der PKC-Isoform ϵ vom Zytosol an die Membran. Diese Translokation wurde in Gegenwart des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin gehemmt. Damit im Einklang wurde die PKC-Isoform ϵ *in vitro* durch das synthetisch hergestellte PI₃-Kinase-Produkt Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat aktiviert (78).

1.1.5 Vesikulärer Transport der Leberzelle

Die molekularen Mechanismen des intrazellulären Transports gallenpflichtiger Substanzen vom basolateralen zum apikalen Leberzellpol sind bisher weitgehend ungeklärt, während ihre Aufnahme über die basolaterale Membran und ihre Ausscheidung über die kanalikuläre Membran in die Gallenkanäle bereits recht gut charakterisiert sind (67). Die Galle wird vorwiegend über einen Prozeß osmotischer Filtration nach ATP-abhängiger Sekretion von Gallensäuren und anderen organischen Anionen und Kationen sowie sekundär parazellulärem Übertritt von Wasser in das Lumen des Kanalikulus gebildet (12). Ein transzytotischer vesikulärer Transport, über den großmolekulare Proteine ausgeschieden werden, spielt für die hepatozelluläre Flüssigkeitssekretion eine untergeordnete Rolle (35). Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, daß der Vesikeltransport beim Targeting und der Insertion von apikalen Transportproteinen wie dem Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher (5) oder dem kanalikulären Gallensalztransporter in die apikale Membran eine entscheidende Rolle spielt (22) und hierüber die Sekretionskapazität der Leberzelle moduliert.

1.2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit möchte am Modell der perfundierten Rattenleber die Bedeutung von PI₃-Kinasen für die durch Gallensäuren modulierte Gallensekretion der Leber untersuchen. Effekte der cholestatisch wirkenden TLCA und der anticholestatisch wirkenden TUDCA auf den Gallenfluß, die biliäre Sekretion von Meerrettichperoxidase (HRP) als einen Parameter für die hepatozelluläre Exozytose, die biliäre Sekretion von 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion (GS-DNP) als Parameter der Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 und die Verteilung der PKC-Isoform ϵ im Lebergewebe werden in Gegenwart und Abwesenheit des potenten PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin verglichen.

Folgende Arbeitshypothesen lagen den Untersuchungen zugrunde:

1. PI₃-Kinasen vermitteln die hemmenden Wirkungen der hydrophoben Gallensäure TLCA auf die hepatozelluläre Exozytose, den Einbau von apikalen Membrantransportproteinen, die Sekretion von cholephilen Substanzen und den Gallenfluß.
2. Im Gegensatz dazu sind PI₃-Kinasen nicht an den stimulierenden Wirkungen der hydrophilen Gallensäure TUDCA auf die bei Cholestase gestörte hepatozelluläre Exozytose, den Einbau von apikalen Membrantransportproteinen, die Sekretion von cholephilen Substanzen und den Gallenfluß beteiligt.

2 Methodik

2.1 Versuchsprotokoll

2.1.1 Perfusionsprotokoll I

Rattenlebern wurden über 25 min rezirkulierend mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (40 ml/min, 1g/dl bovines Serumalbumin/BSA, 0,05 mg/ml HRP) perfundiert (siehe **Abb. 2**). Die Perfusion wurde anschließend auf eine nichtrezirkulierende HRP- und BSA-freie Perfusion mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer umgestellt. Dabei wurde die im Gefäßbett verbliebene HRP über 5 min ausgewaschen. Ab der 40. min erfolgte die Zugabe des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (100 nM oder 500 nM) oder als Kontrolle seines Trägers DMSO (0,001 % v/v) allein. 5 min später wurden Gallensäuren (TLCA, TUDCA, TUDCA und TLCA oder TCDCA) oder als Kontrolle für TLCA deren Träger DMSO (0,1 % v/v) für 50 min bei konstanter Perfusionsrate zugegeben, um portalvenöse Konzentrationen von 10 µM (TLCA) bzw. 25 µM (TUDCA, TCDCA) zu erreichen. Je nach Versuchsgruppe wurden folgende Applikationsschemata angewendet (siehe **Tabelle 1**):

Tabelle 1: Versuchsgruppen des Perfusionsprotokolls I. +: ja, -: nein.				
Gruppe	Wortmannin (40. bis 95. min)	Gallensäuren (45. bis 95. min)		
		TLCA (10 µM)	TUDCA (25 µM)	TCDCA (25 µM)
A	-	-	-	-
B	100 nM	-	-	-
C	-	+	-	-
D	100 nM	+	-	-
E	500 nM	+	-	-
F	-	-	+	-
G	100 nM	-	+	-
H	-	+	+	-
I	100 nM	+	+	-
J	-	-	-	+
K	100 nM	-	-	+

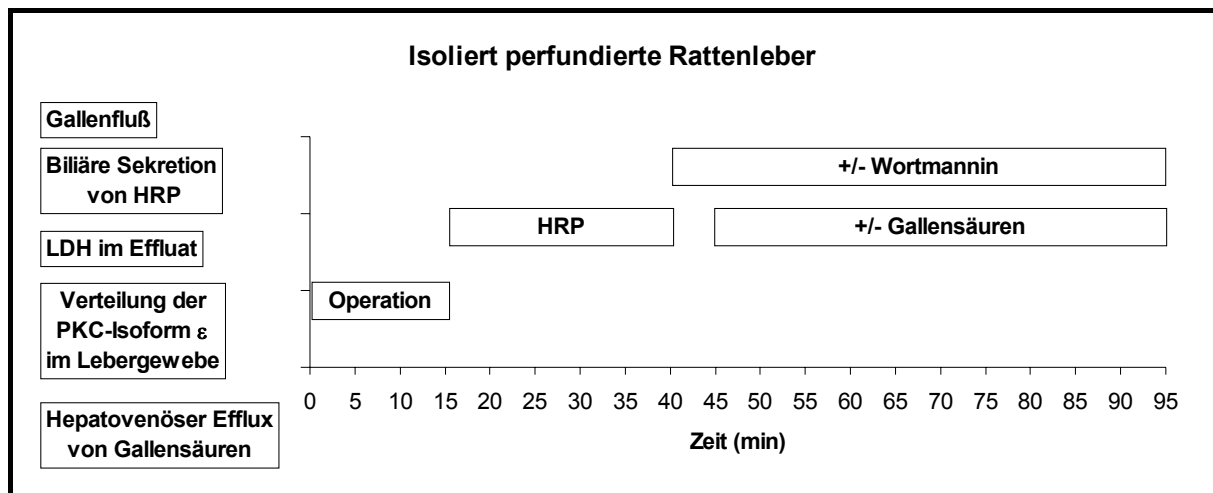


Abb. 2: Versuchsprotokoll I.

An Parametern wurden der Gallenfluß, welcher von der 15. bis zur 95. min in fünfminütigem Abstand gravimetrisch gemessen wurde, die Aktivität der HRP in der gesammelten Galle (zur Quantifizierung der hepatobiliären Exozytose) (10, 119), die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Effluat (als Indikator eines eventuellen Leberschadens) (6, 18, 102) und die Konzentrationen der applizierten Gallensäuren im Effluat (7, 105) erfaßt.

Am Ende des Experiments wurde ein Teil des anterioren Leberlappens exzidiert. Drei Proben von etwa 200 mg Feuchtgewicht wurden unverzüglich in eiskalten Homogenisationspuffer mit Proteaseninhibitoren überführt und wurden dann homogenisiert, um die Gewebsverteilung der PKC-Isoform ϵ mittels Western-Blot zu bestimmen (13, 16) (siehe **Abb. 2**).

2.1.2 Perfusionsprotokoll II

Rattenlebern wurden von der 15. bis zur 95. min nichtrezirkulierend mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (40 ml/min) perfundiert. Von der 15. min an erfolgte die Zugabe des PI_3 -Kinase-Inhibitors Wortmannin (100 nM) oder als Kontrolle seines Trägers DMSO (0,001 % v/v). 5 min später wurden Gallensäuren (TLCA, TUDCA, TUDCA und TLCA oder TCDCA) oder als Kontrolle für TLCA deren Träger DMSO (0,1 % v/v) bis zur 95. min bei konstanter Perfusionsrate zugegeben, um

portalvenöse Konzentrationen von 10 μM (TLCA) bzw. 25 μM (TUDCA, TCDCA) zu erreichen. Je nach Versuchsgruppe wurden folgende Applikationsschemata angewendet (siehe **Tabelle 2**):

Tabelle 2: Versuchsgruppen des Perfusionsprotokolls II. +: ja, -: nein.				
Gruppe	Wortmannin (15. bis 95. min)	Gallensäuren (20. bis 95. min)		
		TLCA (10 μM)	TUDCA (25 μM)	TCDCA (25 μM)
L	-	-	-	-
M	100 nM	-	-	-
N	-	+	-	-
O	100 nM	+	-	-
P	-	-	+	-
Q	100 nM	-	+	-
R	-	+	+	-
S	100 nM	+	+	-
T	-	-	-	+
U	100 nM	-	-	+

Zwischen der 40. und 50. min wurde das organische Anion 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB, 30 μM) infundiert (siehe **Abb. 3**). CDNB wird von Hepatozyten aufgenommen und zu GS-DNP biotransformiert. GS-DNP wird über die apikale Konjugatexportpumpe Mrp2 in die Galle ausgeschieden, wobei bei einer CDNB-Konzentration von 30 μM eine Sättigung der Transportkapazität erreicht wird (117). GS-DNP wurde spektrophotometrisch quantifiziert (siehe **2.4**).

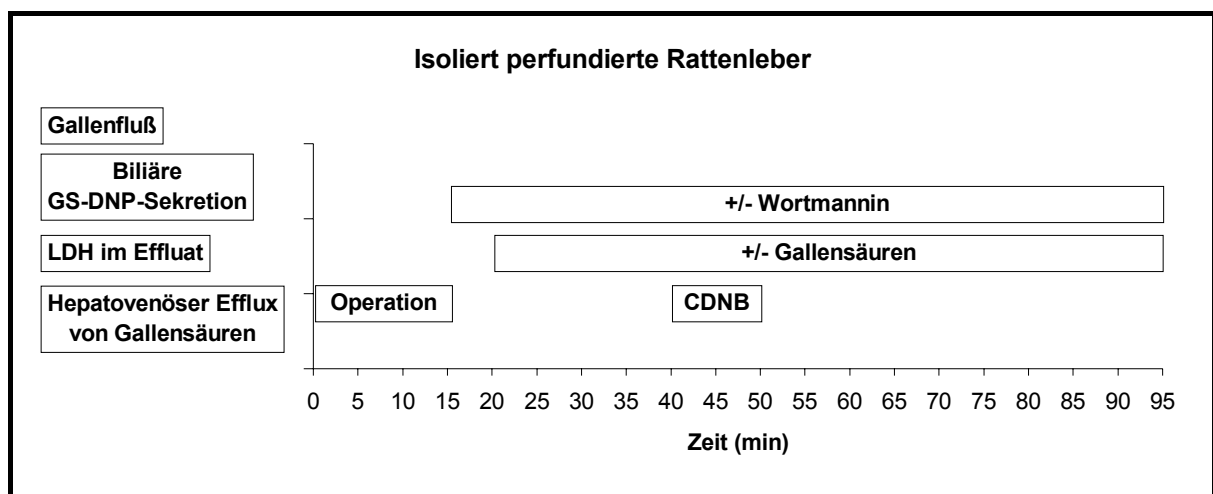


Abb. 3: Versuchsprotokoll II.

2.1.3 Perfusionsprotokoll III

Rattenlebern wurden von der 15. bis zur 95. min nichtrezirkulierend mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (40 ml/min) perfundiert. Von der 15. min an erfolgte die Zugabe des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid I-Hydrochlorid (BIM-I, 1 μ M). 5 min später wurden die Gallensäuren TUDCA (25 μ M) und TLCA (10 μ M) bzw. als Kontrolle der Träger der TLCA, DMSO (0,1 % v/v), bis zur 95. min bei konstanter Perfusionsrate zugegeben. Dabei gab es folgende Versuchsgruppen (siehe **Tabelle 3**):

Tabelle 3: Versuchsgruppen des Perfusionsprotokolls III. +: ja, -: nein.			
Gruppe	BIM-I (15. bis 95. min)	Gallensäuren (20. bis 95. min)	
		TLCA (10 μ M)	TUDCA (25 μ M)
V	1 μ M	-	-
W	1 μ M	+	+

Um im Anschluß an die Perfusion aus der gesammelten Galle die biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP und damit die Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 bestimmen zu können, wurde wie bei Versuchsprotokoll II zwischen der 40. und 50. min über den Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer die Vorläufersubstanz CDNB in einer Konzentration von 30 μ M verabreicht (siehe **Abb. 4**).

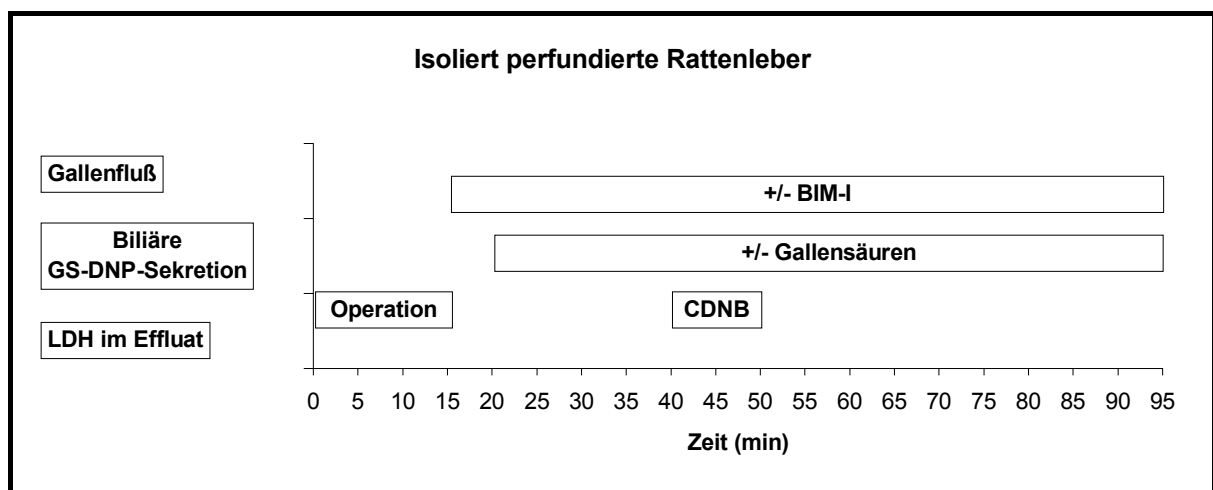


Abb. 4: Versuchsprotokoll III.

2.2 Perfusion der isolierten Rattenlebern (10, 117)

Ratten wurden mittels Natriumpentobarbital (Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, 50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal) anästhesiert. Daraufhin wurde die Leistenregion eröffnet und wurden 0,1 ml Heparin (Heparin-Natrium Braun 25 000 I.E./ml, Braun, Melsungen) in eine oberflächliche Inguinalvene injiziert.

Anschließend wurde die Bauchdecke mittels Medianschnitt eröffnet. Zur Freilegung des Leberpfortenbereichs wurden die Eingeweide nach links verlagert. Dann erfolgte die Anlage einer Ligatur der unteren Hohlvene oberhalb der rechten Nierenvene mittels eines Baumwollfadens der Stärke 50. Als nächstes wurde der pankreatikoduodenale Ast der Pfortader mit zwei Ligaturen versehen. Nach Eröffnung dieses Pfortaderasts mit einer Mikroschere und Kanülierung mit einer 16 G-Venenverweilkanüle (Insyte-W[®] von Becton Dickinson, Sandy, Ut., USA) wurden diese zugezogen. Die Kanüle stand über einen Kunststoffschlauch mit der in den **Abb. 5** und **6** dargestellten Perfusionsanlage in Verbindung und gewährleistete die Perfusion der Leber. Bei Einführen der Kanüle und damit Start der Perfusion wurde die Zeitmessung begonnen. Unmittelbar nach Beginn der Perfusion wurde die untere Hohlvene unterhalb der gesetzten Ligatur eröffnet, um einen freien Ablauf des Perfusats zu gewährleisten und eine Drucküberlastung der Leber zu vermeiden. Darauf wurde der Brustkorb der Ratte eröffnet und das rechte Herz inzidiert. Über den rechten Vorhof wurde die untere Hohlvene mit einer 16 G-Venenverweilkanüle kanüliert, die mit zwei Ligaturen gesichert wurde, um den Abfluß des Perfusats zu gewährleisten. Danach wurde der Gallengang dargestellt und mit einem Polyethylenschlauch (Innendurchmesser 0,40 mm, Außendurchmesser 0,80 mm, von SIMS Portex Ltd., Hythe, Kent, Großbritannien) kanüliert, der ebenfalls mit einer Ligatur gesichert wurde. Zuletzt wurde die Ligatur an der unteren Hohlvene oberhalb der rechten Nierenvene verschlossen. Um das Absinken der Temperatur an der Leberoberfläche zu minimieren, wurde die Leber mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Eine kontinuierliche Messung der Temperatur der Leber erfolgte über eine Temperatursonde, die zwischen den Leberlappen plaziert wurde.

Als Perfusionsmedium wurde Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 1,9 mM CaCl₂, 5,5 mM D-Glukose, pH 7,4, 37 °C) verwendet. Der Puffer wurde über einen Oxygenator mit Carbogen[®] (95% O₂, 5% CO₂, Linde, Höllriegelskreuth) begast und bei einer konstanten Perfusionsrate von 40 ml/min in die Pfortader infundiert. Der portalvenöse Druck wurde mittels einer skalierten Glasröhre vom Einflußschlauch in cm abgelesen.

Die Gallenflüssigkeit wurde von der 15. min an in vorgewogenen Eppendorf-Cups über jeweils 5 min gesammelt, anschließend gravimetrisch quantifiziert und auf Eis gelagert. Das spezifische Gewicht der Gallenflüssigkeit wurde mit 1,0 g/ml angenommen. Um den Gallenfluß auch unabhängig vom Lebergewicht darstellen zu können, wurde dieser als $\mu\text{l Gallenflüssigkeit}/(\text{g Leber} \times \text{min})$ beschrieben.

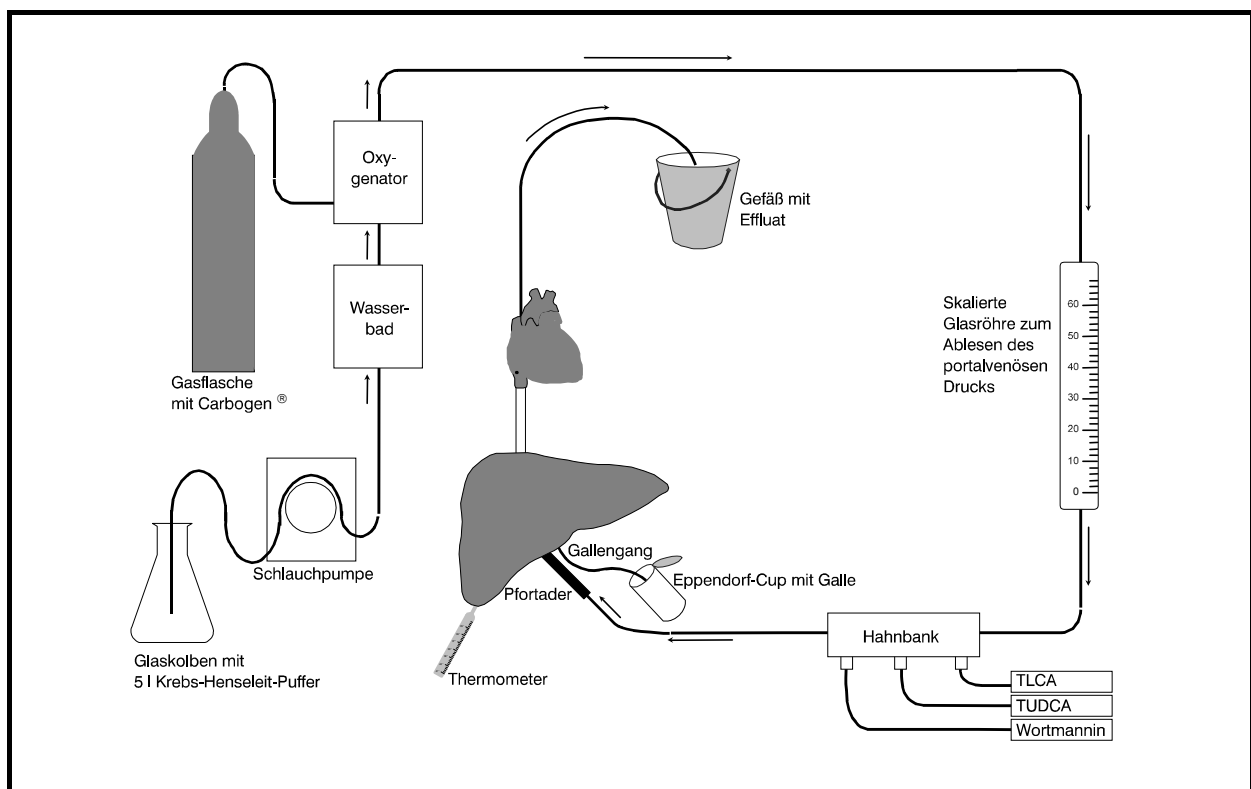


Abb. 5: Anordnung der Perfusionsanlage I. Schlauchpumpe MS-1 Reglo 160/6 (Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld). Perfusorpumpen Perfusor[®] (Braun, Melsungen).



Abb. 6: Anordnung der Perfusionsanlage II.

2.3 Aktivität der HRP in der Galle

2.3.1 Theoretische Grundlagen

Eine Messung der Aktivität der HRP in der gesammelten Galle ermöglicht eine Quantifizierung der hepatobiliären Exozytose nach Vorbeladung der Leber mit HRP im Rahmen einer rezirkulierenden Perfusion. Theoretischer Hintergrund ist, daß dieses Enzym via Transzytose durch die Leberzelle zur Membran des Gallenkanalikulus transportiert wird und dann über Exozytose in den Kanalikulus und damit in die Galle gelangt. Da es unter den gewählten Meßbedingungen nach der 45. min keinen bedeutsamen parazellulären Transport der HRP in die Galle gibt (siehe Protokoll I, 2.1.1), korreliert die Menge und damit die Aktivität der HRP in der Lebergalle mit der Exozytose dieses Enzyms von der Leberzelle in den Kanalikulus (10, 119).

2.3.2 Durchführung der Bestimmung

Die zuvor auf Eis gelagerten Gallenproben wurden mit einem Schüttelgerät homogenisiert und dann für 1 min mit einer Tischzentrifuge (Zentrifuge 3200, Eppendorf, Hamburg) bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die nachfolgend beschriebenen Messungen verwendet.

5 µl Galle wurden mit 750 µl H₂O₂-Puffer und 700 µl 2,5 mM 4-Aminoantipyrin, 0,17 M Phenol-Lösung (lichtempfindlich) in eine Küvette gegeben.

Herstellung des H₂O₂-Puffers: 1 ml 0,3 % H₂O₂ ad 50 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0, 5,44 g KH₂PO₄ in 200 ml Aqua bidest. gelöst, 13,93 g K₂HPO₄ in 400 ml Aqua bidest. gelöst, wobei beide Lösungen gegeneinander auf pH 7,0 titriert wurden).

Herstellung der 2,5 mM 4-Aminoantipyrin, 0,17 M Phenol-Lösung: 25,4 mg 4-Aminoantipyrin wurden auf der Analysenwaage abgewogen und in einen 50 ml-Meßkolben überführt. Ferner wurden 0,80 g Phenol abgewogen und ebenfalls in den Meßkolben gegeben. Dann wurde dieser mit Aqua bidest. bis zur Eichmarke aufgefüllt und gut geschüttelt.

Nachdem der Meßansatz gut gemischt worden war, wurde die Zunahme der Extinktion bei 510 nm bei 25 °C in einem Photometer des Typs U-1100 Spectrophotometer von Hitachi Ltd. (Tokio, Japan) in einminütigem Abstand über 5 min gemessen. Um eine gute Reproduzierbarkeit der photometrischen Messungen zu gewährleisten, wurde täglich eine Kontrollmessung mit einer Standardkurve durchgeführt. Dazu wurde eine HRP-Stammlösung (45 mg/l) zubereitet und hiervon eine Verdünnungsreihe (4,5 – 3,6 – 2,7 – 1,8 – 0,9 – 0,45 µg/ml) hergestellt.

Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte nach der Formel:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta A_{510 \text{ nm}} \cdot 1455 \text{ U}}{\Delta t \cdot 5 \cdot 6,58 \text{ ml}}$$

ΔA : Absorptionsänderung

Δt : Meßabstand (min)

Anschließend wurde die Volumenaktivität in die Masse der HRP umgerechnet, wobei entsprechend den Angaben des Herstellers 200 U einem Milligramm HRP gleichgesetzt wurden.

Um eine Vergleichbarkeit der ausgeschiedenen HRP-Menge unabhängig vom Lebergewicht zu ermöglichen, wurde diese als ng HRP/(g Leber x min) (HRP-Quotient) dargestellt. Neben der absoluten hepatobiliären HRP-Sekretion wurden auch die relativen Werte, bezogen auf das Intervall von der 40. bis zur 45. min, dargestellt. Dies erschien erforderlich, da es im Verlauf der mehrere Monate dauernden Meßphase zwischen unterschiedlichen Versuchsreihen zu Schwankungen der Basisaktivität der HRP kam, die einen Vergleich der verschiedenen Gruppen erschwerte. Den Aktivitätsschwankungen lag möglicherweise unter anderem die Verwendung von HRP unterschiedlicher Chargen desselben Herstellers zu Grunde. Die Darstellung der relativen HRP-Sekretion zusätzlich zur Dokumentation der absoluten Enzymaktivität in der Galle erschien für Vergleiche zwischen den Versuchsserien daher sinnvoll.

2.4 Biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP

2.4.1 Theoretische Grundlagen

Eine Messung der Konzentration des Mrp2-Substrats GS-DNP in der gesammelten Galle ermöglicht eine Quantifizierung der sekretorischen Kapazität des apikalen

Transportproteins Mrp2 nach Vorbeladung der Leber mit CDNB. CDNB wurde in einer Konzentration von 30 μM in der Pfortader verabreicht. Bei dieser Konzentration wird eine Sättigung der biliären GS-DNP-Sekretion in der perfundierten Rattenleber erreicht (92, 117).

CDNB wird in der Zelle unter Abspaltung von Salzsäure als Thioäther an Glutathion gebunden. GS-DNP wird dann als organisches Modellanion über die Transportpumpe Mrp2 vom Zellinneren über die apikale Membran in den Gallenkanalikus transportiert. Die Menge von GS-DNP in der gesammelten Galle korreliert gut mit der sekretorischen Kapazität und damit auch der Anzahl der Transportpumpen an der apikalen Membran (92, 117).

2.4.2 Durchführung der Bestimmung

Die Bestimmung von GS-DNP erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 335 nm (92, 117). Dabei wurden in jede Küvette 1000 μl Aqua bidest. und 5 μl der jeweiligen Gallenprobe pipettiert. Nachdem der Küvetteninhalt gut gemischt worden war, wurde die Extinktion gegen Wasser als Blindprobe im Photometer gemessen.

Die Konzentration (c) wurde über folgende Formel bestimmt:

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

E: Extinktion

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient ($\text{l}/(\text{nmol} \times \text{cm})$)

ϵ (335 nm) = 9,6 $\text{l}/(\text{nmol} \times \text{cm})$

d: Schichtdicke (hier 1 cm)

V_{Probe} : Volumen der Probe

V_{ges} : Gesamtvolumen in der Küvette

Da die Eigenabsorption der gemessenen Galle bei 335 nm nicht konstant war, mußten die Extinktionswerte entsprechend korrigiert werden. Dabei galt der letzte Extinktionswert vor der CDNB-Zugabe als Nullpunkt und wurde von den anderen Extinktionswerten abgezogen.

2.5 Hepatovenöser Efflux der LDH

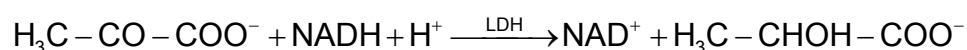
Die Aktivität der LDH im hepatovenösen Effluat wurde als ein Indikator des Leberzellschadens gemessen (18, 102).

Dabei wurde ein photometrischer Standardtest (6) unter Zugabe von 500 µl 0,60 mM Pyruvatpuffer und 10 µl NADH-Lösung (10 mg/ml) zu 500 µl Effluat bei 365 nm Wellenlänge durchgeführt. Die Extinktion wurde 1 bzw. 3 min nach Start der Reaktion gemessen.

Herstellung des 0,60 mM Pyruvatpuffers: 66,6 mg Natriumpyruvat ad 1000 ml 50 mM Phosphatpuffer (8,71 g K₂HPO₄ ad 1000 ml Aqua bidest., 3,40 g KH₂PO₄ ad 500 ml Aqua bidest., wobei die beiden Lösungen gegeneinander auf pH 7,5 titriert wurden und bei 4 °C aufbewahrt wurden).

Herstellung der NADH-Lösung (10 mg/ml): 10 mg NADH-Na₂ wurden in einem Eppendorf-Cup eingewogen und in 0,5 % NaHCO₃-Lösung gelöst.

Der Bestimmung liegt der Umstand zugrunde, daß Pyruvat in Anwesenheit von LDH und NADH/H⁺ zu Laktat und NAD⁺ umgewandelt wird, welches bei 365 nm Wellenlänge photometrisch gemessen werden kann:



Die Volumenaktivität (z) der LDH im Effluat wurde aus der gemessenen Abnahme der Extinktion nach folgender Formel berechnet:

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

ΔE : Extinktionsänderung

ε : molarer Extinktionskoeffizient (l/(mmol x cm))

ε (365 nm) = 3,4 l/(mmol x cm)

d: Schichtdicke (hier 1 cm)

Δt : Meßabstand (min)

V: Volumen des gesamten Testansatzes in der Küvette

V_{Probe} : Volumen der Probe

2.6 Hepatovenöser Efflux der Gallensäuren

Der hepatovenöse Efflux der applizierten Gallensäuren wurde gaschromatographisch bestimmt (7, 105). Zuvor erfolgte eine Aufbereitung des Effluats.

Zu 2 ml Effluat wurden 50 μ l einer internen Standardlösung (2,5 μ g Hyodeoxycholsäure gelöst in 50 μ l Methanol) gegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend langsam durch vorbereitete Bond-Elut-C18-Säulen (Varian, Harbor City, Cal., USA) gesogen.

Vorbereitung der Bond-Elut-Säulen: Die Säulen wurden vor ihrer Verwendung mit 5 ml Methanol, mit 5 ml Aqua bidest. und schließlich mit 2 ml 0,1 M NaOH gewaschen.

Nach Waschen mit je 5 ml 0,1 M NaOH bzw. Aqua bidest. erfolgte eine Elution der Gallensäuren mit 6 ml eines Methanol-Wasser-Gemisches (75 : 25).

Nachdem das Eluat im Wasserbad bei 64 °C unter Stickstoff eingedampft worden war, wurden die Gallensäurenkonjugate enzymatisch hydrolysiert. Dazu wurde der Rückstand in 4 ml Aqua bidest. aufgenommen und der pH-Wert mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 bis 6,0 eingestellt. Nach Zugabe von 400 µl 0,1 M Natriumazetatpuffer wurde die Lösung für 1 min ins Ultraschallbad gestellt.

Im folgenden wurden 20 µl einer Enzymlösung (Choloylglyzinhydrolase, 1000 U/ml, Sigma, St. Louis, Mo., USA), 100 µl 0,2 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung und 100 µl 0,2 M Mercaptoethanolösung zugegeben und das Gemisch im Wasserbad bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der pH-Wert nach dem Abkühlen der Proben mit 1 M HCl auf 3,5 eingestellt. Dann wurden die Proben langsam durch vorbereitete Lipidex[®]-1000-Säulen gesogen.

Vorbereitung der Lipidex[®]-1000-Säulen: Leere 1 ml-Bond-Elut-Säulen wurden mit Lipidex[®] 1000 (Packard Instrument B.V. Chemical Operations, Groningen, Niederlande) gefüllt und anschließend mit 10 ml Methanol bzw. 3 ml 0,01 M HCl gewaschen.

Nach einem Waschvorgang mit zweimal 7 ml 0,01 M HCl und dreimal 7 ml Aqua bidest. erfolgte eine Elution der Proben mit 10 ml Methanol-Wasser-Gemisch (75 : 25) und ein erneutes Eindampfen im Wasserbad unter Stickstoff bei 64 °C.

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

Im Rahmen der anschließenden Silylierung wurden 0,4 ml frisches Trimethylsilyl (TMS)-Reagens zugegeben, gut geschüttelt und die Lösung für 15 min im Wasserbad bei 64 °C stehengelassen.

Herstellung des TMS-Reagens: 1,5 ml Pyridin, 1 ml Hexamethyldisilazan und 0,5 ml Chlortrimethylsilan wurden vermischt und 45 min lang bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Für die Analyse wurde nur der klare Überstand verwendet.

Dann erfolgte wiederum ein Abdampfen des Ansatzes unter Stickstoff im Wasserbad bei 64 °C. Der Überstand wurde in 1,5 ml Iso-Oktan aufgenommen und in Mini-Vials überführt. Zuletzt wurde das Iso-Oktan unter Stickstoff abgedampft und der verbleibende Rest in 25 µl Iso-Oktan gelöst.

Die Methylestertrimethylsilylätherderivate wurden dann gaschromatographisch auf Silikatkapillarsäulen (Länge 25 m, Durchmesser 0,32 mm) mit chemisch gebundenen OV-1701 getrennt. Der Gaschromatograph war ein Carlo Erba Fractovap 4160, wobei als Trägergas Wasserstoff ($p = 0,6 \text{ kg/cm}^2$) verwendet wurde. Die Detektion der Gallensäuren erfolgte mittels eines Flammenionisationsdetektors. Die untere Nachweisgrenze betrug 0,2 µM. Einzelne Proben wurden darüber hinaus mit einem Massenspektrometriesystem Finnigan 4021 näher charakterisiert, wobei Helium das Trägergas war (7, 105).

2.7 Verteilung der PKC-Isoform ϵ im Lebergewebe

2.7.1 Verarbeitung der Lebergewebsproben für den Western-Blot

Die Verteilung der PKC-Isoform ϵ im Leberhomogenat wurde mittels einer Western-Blot-Technik bestimmt. Drei Leberstückchen von etwa je 200 mg Feuchtgewicht wurden aus dem anterioren Leberlappen am Ende eines jeden Perfusionsexperiments exzidiert und dann unverzüglich in eiskalten Homogenisationspuffer (1 ml/200 mg Gewebe, 20 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), 250 mM Saccharose, 2 mM EGTA (Ethylendioxybis(ethylenitrilo)-N,N,N',N'-tetraessigsäure), 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 10 mM β -Mercaptoethanol, 50 µM Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, pH 7,4) überführt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C mit einem Ultraschallhomogenisator homogenisiert.

Das Homogenat wurde über 2 min bei 8000 g zentrifugiert. 130 µl des Überstands wurden in einer Ultrazentrifuge Airfuge[®] A 110 von Beckman Instruments Inc. (Palo Alto, Cal., USA) bei 25 psi (140 000 g, 1 psi = 6,89 kPa) 8 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde als die Zytosolfraktion gesammelt, während das Pellet in 130 µl Homogenisationspuffer resuspendiert wurde und als Membranfraktion gesammelt wurde.

Der Eiweißgehalt jeder Probe wurde nach Bradford bestimmt (23).

2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western-Blotting, Densitometrie (13, 16)

Das Volumen einer jeden Probe wurde durch Zugabe von Homogenisationspuffer (siehe 2.7.1) zunächst verfünffacht, dann durch weitere Zugabe von Probenpuffer (25 mM Tris, 2 mM EGTA, 20 % Glycerol, 10 % Mercaptoethanol, 4 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,001 % Bromphenolblau, pH 6,8) noch einmal verdoppelt.

Aliquots jeder Probe wurden einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit 8 % Polyacrylamidgel unterzogen. Die Proteine wurden auf Immobilon-P-Membranen übertragen, woraufhin diese bei Raumtemperatur für 30 min in einen Blockierungspuffer (100 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer, 3 % BSA, 0,2 % Tween 20, 0,02 % Natriumazid, pH 7,2) gelegt wurden. Anschließend wurden sie in einem Inkubationspuffer (identisch mit dem Blockierungspuffer, aber mit 0,1 % BSA und 0,05 % SDS) für mindestens 12 h inkubiert. Der Inkubationspuffer enthielt affinitätsgereinigte isoenzymspezifische Antikörper für ϵ -PKC.

Die Membranen wurden dann dreimal für 5 min in einem Waschpuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1 % Tween 20, pH 7,2) unter ständigem Schütteln gewaschen und für 60 min in einem Inkubationspuffer mit Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin G-Antikörpern (1 : 3000) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden wieder fünfmal 5 min im Waschpuffer gewaschen. Die immunreaktiven Banden

wurden mit einem Chemolumineszenzreagens lokalisiert. Die Bande des PKC-Isoenzyms ϵ wurde über ihr Molekulargewicht mittels eines Molekulargewichtsmarkers und einer Rattenhirnzytosolpräparation, die reich an der PKC-Isoform ϵ ist, identifiziert. Der Molekulargewichtsmarker und die Rattenhirnzytosolpräparation wurden auf jedes Gel aufgetragen. Voruntersuchungen an isolierten Rattenhepatozyten hatten zudem zeigen können, daß sowohl TLCA als auch der Phorbol-12-Myristat-13-Azetat zu einer Translokation der PKC-Isoform ϵ , einem Protein mit einem Molekulargewicht von 90 kDa, vom Zytosol an die Membran führten. Die in Hepatozyten isolierte „Proteinbande“ entsprach der nun in Lebergewebe identifizierten Bande. In Voruntersuchungen waren die Banden nach Inkubation mit Antikörpern gegen die PKC-Isoform ϵ in Gegenwart und Abwesenheit des Antigens verglichen worden. Auch hier war der PKC-Isoform ϵ nur die Bande mit einem Molekulargewicht von 90 kDa zugeordnet worden. Der Nachweis von ϵ -PKC mit der beschriebenen Methodik kann daher als ausreichend spezifisch angesehen werden (16).

Die Bande der PKC-Isoform ϵ wurde densitometrisch (NIH Image Densitometric Analysis 1.54, Bethesda, Md., 1994) mit Hilfe des Computerprogramms TINA (Version 2.10g von Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden als (optische Dichte der jeweiligen Fraktion/optische Dichte der Zytosol- + der Membranfraktion) x 100 % beschrieben.

2.8 PI₃-Kinase-Assay an Hep G2-Zellen

2.8.1 Transfektion von Hep G2-Zellen mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt (41)

Hep G2-Zellen (ATCC HB-8065) wurden in supplementiertem MEM (minimal essential medium, 10 % fötales Rinderserum, 1 % nichtessentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B, pH 7,4, 37 °C, 5 % CO₂) angezchtet.

Anschließend wurden die Hep G2-Zellen zur Transfektion mit Ratten-Ntcp auf 24-Well-Gewebekulturplatten aufgetragen. Nachdem die Zellen 80 % des Plattenbodens konfluent wachsend bedeckten, erfolgte die Transfektion mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt. Das Kulturmedium in den Wells wurde daraufhin durch je 200 µl serumfreies Medium ersetzt, das 0,75 µg Plasmid-cDNA und 9 µg Tfx[®]-20-Reagens enthielt. Nach 1 h Inkubationszeit (37 °C, 5 % CO₂) wurden 800 µl Wachstumsmedium in jedes Well gegeben. Schließlich wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurde durch Wachstum in einem mit Geneticin[®] (250 µg/ml) angereicherten Kulturmedium eine kontinuierliche Selektion zu Gunsten der effizient transfizierten Hep G2-Zellen erreicht.

2.8.2 Vorbereitung der Hep G2-Zellen für den PI₃-Kinase-Assay (modifiziert nach 66)

Die pcDNA 3.1/Ntcp-transfizierten Hep G2-Zellen wuchsen in supplementiertem MEM (siehe 2.8.1) bei 37 °C bis zur Konfluenz heran. Anschließend wurde das Medium durch 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) ersetzt. Nach zehnminütiger Inkubation wurden die Zellen durch Klopfen gelöst und 10 ml supplementiertes MEM zugegeben. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge Rotina 46 R von Hettich, Tuttlingen) über 10 min bei 210 g und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml supplementiertem MEM resuspendiert.

Für eine erneute Zellpassage wurden 16 ml Zellsuspension mit supplementiertem MEM auf 60 ml verdünnt und auf fünf 6-Well-Schalen verteilt (2 ml/Well). Die Zellen ließ man daraufhin bis zur 75prozentigen Konfluenz heranwachsen.

Bei Versuchsbeginn wurde das Medium entfernt und wurden die Wells mit je 2 ml PBS (ohne Kalzium, Magnesium und Bikarbonat) unter Schütteln gewaschen.

Im Anschluß wurden die Zellen mit 2 ml MEM pro Well für die folgende Gallensäureaufnahme 16 bis 24 h inkubiert.

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Wells erneut mit PBS (ohne Kalzium, Magnesium und Bikarbonat) unter Schütteln gewaschen. Die Zellen wurden mit 2 ml MEM und je nach Versuchsgruppe mit 25 µM TLCA (gelöst in 0,1 % DMSO), 25 µM TUDCA, DMSO (0,1 % v/v) oder Insulin (41,8 x 10⁻⁶ I.E., Insuman[®] Rapid 40 I.E./ml) über 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Platten wurden auf Eis gelegt, das Medium rasch abgesaugt und die Wells mit je 2 ml eiskaltem Puffer A (137 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM Na₃VO₄, mit Aqua bidest. ad 250 ml, pH 7,4) dreimal gewaschen. Pro Well wurden 150 µl eiskalter Lysispuffer (10 % Glycerin, 1 % Triton X-100, 50 mM Hepes (2,4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethansulfonsäure), 100 mM Na₄P₂O₇ x 10 H₂O, 100 mM NaF, 10 mM EDTA, mit Aqua bidest. ad 50 ml, pH 7,4, unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von 10 µg/ml Aprotinin, 10,5 µM Leupeptin, 1,5 mg/ml Benzamidin, 0,2 µM PMSF und 5 mM Na₃VO₄) zugegeben. Dann erfolgte unter Schütteln eine 20minütige Inkubation mit eiskaltem Lysispuffer (150 µl/Well) im Kühlraum. Nachdem die Zellen gelöst und in Eppendorf-Cups überführt worden waren, wurde die Zellsuspension 15 sec lang auf Eis bei 20 W mit einem Ultraschallhomogenisator homogenisiert. Schließlich wurden alle Cups 10 min lang bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert (Zentrifuge EBA 12 R von Hettich, Tuttlingen).

Das klare Zentrifugat wurde in ein neues Cup überführt. Nach Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (23) wurden die Proben auf die gleiche Proteinmenge eingestellt und mit PBS auf 500 µl aufgefüllt.

2.8.3 Immunpräzipitation

In jedes Probencup wurden 4 µl Anti-PI₃-Kinase-p110 α -Antikörper pipettiert. Nach Rotation über Nacht bei 4 °C wurden am folgenden Tag je 80 µl A/G Plus-Agarose zupipettiert und der Ansatz weitere 2 bis 4 h unter Rotation bei 4 °C vermischt. Dann wurden 20 µg Phosphatidylinositol je durchzuführendem Assay in ein Cup gegeben und das als Lösungsmittel verwendete Chloroform unter Stickstoff abgeblasen. Nach Zugabe von 10 µl Ultraschallpuffer (10 mM Tris, 1 mM EGTA, pH 7,5) wurde der Ansatz 10 min lang im Ultraschalleisbad suspendiert. Anschließend wurden die

Proben bei 4 °C und 20 000 g 1 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und 500 µl Lysispuffer (siehe 2.8.2) zugegeben. Nach gründlichem Vermischen wurde wieder bei 4 °C und 20 000 g 1 min lang zentrifugiert. Dann wurde der Überstand nochmals durch 500 µl Lysispuffer ersetzt, zentrifugiert und der restliche Überstand abpipettiert.

Aus Gründen des Strahlenschutzes wurden die folgenden Arbeitsschritte hinter einem Schutzschild aus Acrylglas durchgeführt.

Zu jedem Ansatz wurden 30 µl TNE-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 5 mM EDTA, mit Aqua bidest. ad 100 ml, pH 7,4, autoklaviert), 10 µl Phosphatidylinositol-Lösung (2 µg/µl), 10 µl 1 M Magnesiumlösung, 5 µl ATP-Reaktionslösung (3 µl [γ -³²P]-ATP (5 µCi/µl), 1 µl 1 M Magnesiumlösung, 1 µl 11 mM ATP-Lösung) gegeben.

Nach kurzem Zentrifugieren und Vortexen wurde der Ansatz über 10 min bei 37 °C im Thermoblock inkubiert und nach 5 min nochmals gevortext. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 160 µl Chloroform/Methanol/12 M HCl-Lösung (55 : 110 : 1) gestoppt. Zur Extraktion wurden nach gründlichem Vortexen nochmals 160 µl Chloroform zugegeben. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 4 °C und 20 000 g wurde der Überstand in den Radioaktivabfall verworfen. Im folgenden Waschschrift wurden 150 µl Methanol/1 M HCl-Lösung (1 : 1), 20 µl 8 M HCl-Lösung und 160 µl Chloroform/Methanol-Lösung (1 : 1) in die organische Phase pipettiert. Dann wurde nach 30sekündigem Vortexen 10 min bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde in den Radioaktivabfall entsorgt, die organische Phase mit Stickstoff auf etwa 40 µl abgeblasen und dann vollständig auf eine Kieselgel 60-Dünnschichtchromatographiefolie (Merck, Darmstadt) in 5- bis 10 µl-Schritten aufgetragen. Nach 20minütigem Trocknen wurden die Platten in die Dünnschichtchromatographiekammer gestellt. Die chromatographische Auftrennung des PI_3 -Kinase-Produkts Phosphatidylinositol-3-Phosphat erfolgte durch den kapillären Aufstieg des Fließmittels (Chloroform/Methanol/Aqua bidest./25 % Ammoniaklösung = 60 : 47 : 11,3 : 2). Dann wurden die Platten etwa 30 min lang im Radioaktivabzug getrocknet.

Zuletzt wurden die Platten in der Dunkelkammer mit Biomax MR-Film (von Kodak, Rochester, N. Y., USA) in Filmkassetten eingelegt. Nach einer Belichtungszeit von mindestens 18 h bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte die Entwicklung. Die Substanzflecken für Phosphatidylinositol-3-Phosphat wurden densitometrisch (NIH Image Densitometric Analysis 1.54, Bethesda, Md., 1994) mit Hilfe des Computerprogramms TINA (Version 2.10g von Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden als optische Dichte des jeweiligen Substanzflecks/optische Dichte der Kontrolle beschrieben.

2.9 Materialien

2.9.1 Wortmannin

Wortmannin ist ein leicht zellgängiges antifungales Antibiotikum, das von *Penicillium fumiculosum* isoliert wird. Wortmannin ist ein spezifischer und potenter Inhibitor der PI_3 -Kinasen (88). Die Inhibition erfolgt durch direkte Interaktion mit der katalytischen Untereinheit (110 kDa) (120).

Wortmannin inhibierte die Aktivität von partiell gereinigter PI_3 -Kinase aus Kälberthymus in niedrigen Konzentrationen wie 1 nM mit IC_{50} -Werten von 3 nM (120) und bei Mauszellen mit IC_{50} -Werten von 2 bis 4 nM (88). Kinetische Analysen zeigten, daß die Hemmung nichtkompetitiv und irreversibel war (88).

Die molekulare Struktur von Wortmannin wird in **Abb. 7** dargestellt.

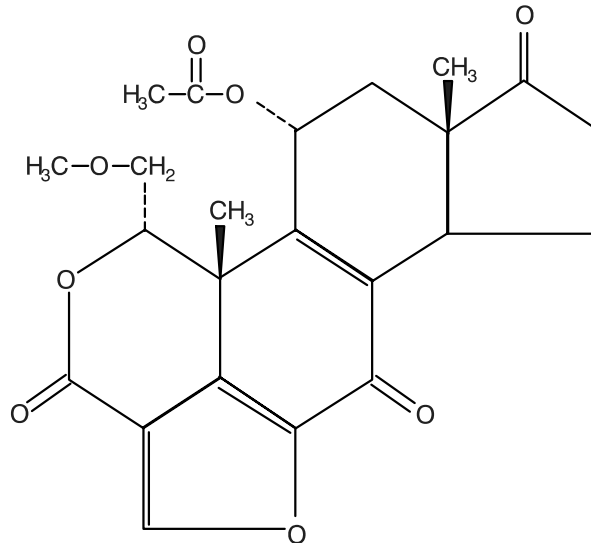


Abb. 7: Wortmannin (90).

2.9.2 Bisindolylmaleimid-I-Hydrochlorid

Bisindolylmaleimid-I-Hydrochlorid (BIM-I, Synonyme: Gö 6850, GF 109203 X) ist ein hochselektiver, zellpermeabler Inhibitor der PKC ($K_i = 14 \pm 3$ nM). Es wirkt als kompetitiver Inhibitor an der ATP-Bindungsstelle der PKC (112). Die kalziumsensitive α -Isoform der PKC ist gegenüber einer Blockade durch BIM-I besonders empfindlich. Die IC_{50} liegt für die α -Isoform mit $8,4 \pm 2,6$ nM etwa 16fach niedriger als für die ε -Isoform mit 132 ± 20 nM (74). Im Vergleich mit den früher häufig verwendeten Antagonisten Staurosporin und H-7 zeichnet sich BIM-I in der verwendeten Konzentration durch eine hohe Spezifität für die PKC aus (74, 112).

Die molekulare Struktur von BIM-I wird in **Abb. 8** dargestellt.

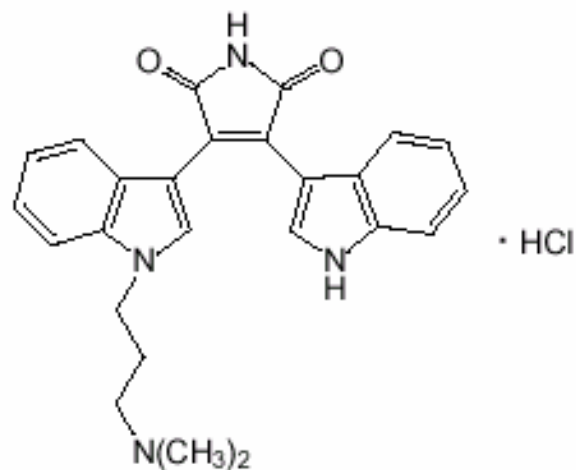


Abb. 8: BIM-I (89).

2.9.3 Chemikalien und Biochemikalien

Gegen die PKC-Isoform ϵ gerichtete Kaninchen-anti-Peptid-Antikörper, Protein-A Agarose, MEM, fötales Rinderserum, PBS, L-Glutamin, Nichtessentielle-Aminosäuren-Lösung, Natriumpyruvatlösung, Antibiotika-Antimykotika-Lösung, Geneticin[®] und Trypsin/EDTA-Lösung von Gibco (Grand Island, N. Y., USA). Molekulargewichtsmarker von Amersham (Braunschweig). Immobilon-P Membranen von Millipore (Eschborn). Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin G-Antikörper von Bio-Rad Lab (München). Gallensäuren (TUDCA, TLCA, TCDCA), Wortmannin, DMSO, HRP (Typ II), Albumin (Fraktion V), Choloylglyzinhydrolase, NADH-Na₂ sowie Phosphatidylinositol von Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). CDNB von ICN Biomedicals Inc. (Aurora, O., USA). BIM-I von Calbiochem-Novabiochem Corp. (Nottingham, Großbritannien). Chemolumineszenzreagens von DuPont NEN (Boston, Ma., USA). Anti-PI₃-Kinase-p110 α -Antiserum von Upstate Biotechnology (Lake Placid, N. Y., USA). [γ ³²P]-ATP von NEN (Zaventem, Belgien). Protein A/G Plus-Agarose von Santa-Cruz. Insuman[®] Rapid 40 I.E./ml von Hoechst Marion Roussel. Tfx[®]-20-Reagens von Promega (Madison, Wis., USA). Bond-Elut-C18-Kartuschen von Analytichem International (San Diego, Cal., USA). Silikatkapillarsäulen mit chemisch gebundenen OV-1701 von Chrompack (Nijmegen, Niederlande).

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren vom höchsten Reinheitsgrad, der verfügbar war.

2.10 Tiere

Männliche CD[®]-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 229 ± 16 g zum Zeitpunkt der Versuche wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Bis zum Beginn der Experimente befanden sich die Ratten in Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 24 °C. Der Rattenstall war zwischen 4.30 und 16.30 Uhr beleuchtet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

2.11 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) beschrieben. Die Ergebnisse zwischen verschiedenen Versuchsgruppen wurden mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test verglichen. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel 97 von Microsoft. Wenn von arbiträren Einheiten (A.E.) die Rede ist, so entspricht eine A.E. einem Prozent.

3 Ergebnisse

Die Bedeutung der PI₃-Kinase für die durch die Gallensäuren TLCA, TCDCA und TUDCA induzierte Modulation von Gallenfluß, hepatozellulärer Exozytose, Verteilung der PKC-Isoform ϵ und Leberintegrität, gemessen an der LDH-Abgabe in die Lebervenen, wurde an der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht.

3.1 Versuchsreihe I

Rattenlebern wurden für 25 min in einer rezirkulierenden Perfusion mit HRP beladen (siehe Perfusionsprotokoll I, **2.1.1**). Nach einer fünfminütigen Auswaschphase wurden Gallensäuren für 50 min im Rahmen einer nichtrezirkulierenden Leberperfusion mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer kontinuierlich in die Pfortader infundiert. Die PI₃-Kinasen der Leberzellen wurden durch Gabe des spezifischen PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin gehemmt.

3.1.1 Gallenfluß

3.1.1.1 Effekt von Wortmannin

Der Gallenfluß betrug bei unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) zu Beginn der nichtrezirkulierenden Perfusion (40. bis 45. min) $1,1 \pm 0,1 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$. In der nachfolgenden Versuchsperiode lag der Gallenfluß bei $52,2 \pm 4,4 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$.

Der Gallenfluß zeigte unter Gabe des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin keine signifikante Änderung gegenüber Kontrollen während der gesamten Versuchsdauer (siehe **Tabelle 4** und **Abb. 9**).

Tabelle 4: Gallenfluß bei Kontrollen ± Wortmannin (MW ± SD). Relativer Gallenfluß: min 45 = 100 %.

Gruppe Zeit (min)	A (Kontrolle, n = 5)		B (Wortmannin 100 nM, n = 5)	
	Gallenfluß ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)	Relativer Gallenfluß (%)	Gallenfluß ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)	Relativer Gallenfluß (%)
20	1,25 ± 0,10	121 ± 15	1,23 ± 0,24	116 ± 18
25	0,98 ± 0,21	93 ± 11	0,97 ± 0,21	92 ± 18
30	1,18 ± 0,17	113 ± 8	1,19 ± 0,19	113 ± 15
35	1,12 ± 0,15	108 ± 6	1,12 ± 0,11	107 ± 8
40	1,08 ± 0,16	103 ± 5	1,07 ± 0,08	101 ± 4
45	1,05 ± 0,13	100 ± 0	1,05 ± 0,09	100 ± 0
50	1,09 ± 0,11	105 ± 11	1,13 ± 0,06	108 ± 6
55	1,10 ± 0,11	106 ± 7	1,10 ± 0,08	105 ± 2
60	1,10 ± 0,09	106 ± 7	1,12 ± 0,10	106 ± 3
65	1,09 ± 0,10	105 ± 8	1,11 ± 0,14	105 ± 6
70	1,08 ± 0,09	104 ± 9	1,12 ± 0,13	106 ± 5
75	1,05 ± 0,09	101 ± 9	1,13 ± 0,13	107 ± 6
80	1,01 ± 0,10	97 ± 10	1,10 ± 0,12	105 ± 7
85	1,01 ± 0,08	97 ± 11	1,08 ± 0,10	102 ± 5
90	0,97 ± 0,09	94 ± 12	1,06 ± 0,10	101 ± 6
95	0,94 ± 0,06	91 ± 12	1,01 ± 0,09	96 ± 6
Gallenfluß	52,19 ± 4,42 $\mu\text{l}/(\text{g} \times 50 \text{ min})$	5027 ± 472 A.E./50 min	54,85 ± 5,12 $\mu\text{l}/(\text{g} \times 50 \text{ min})$	5209 ± 234 A.E./50 min

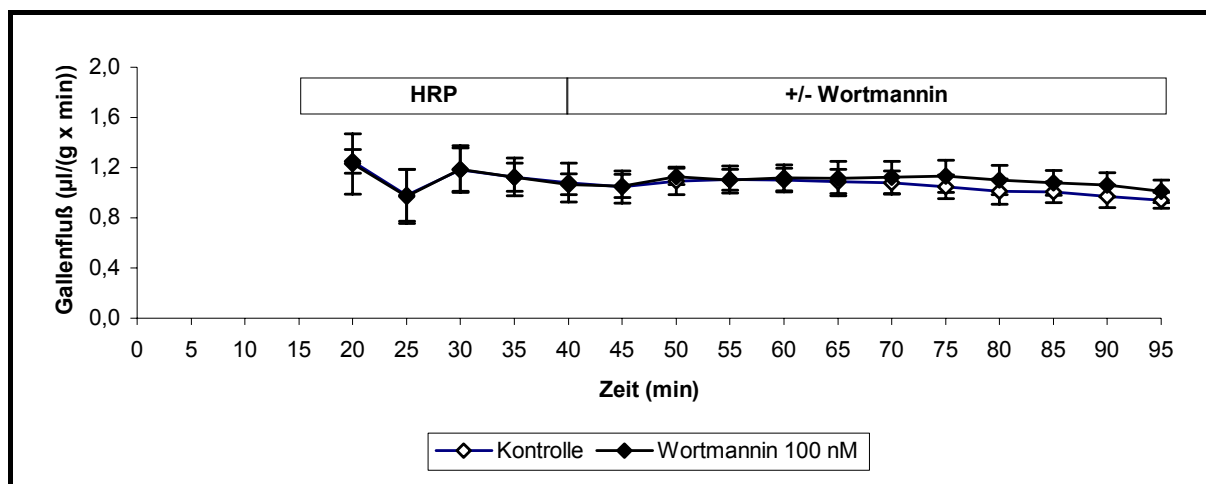


Abb. 9: Gallenfluß in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.1.1.2 Effekt von TLCA

Der Gallenfluß nahm nach Zugabe der hydrophoben Gallensäure TLCA (ab 45. min, **Gruppe C**) deutlich bis auf unter 10 % des Ausgangswertes ab.

Die Zugabe von Wortmannin (100 nM, **Gruppe D**, und 500 nM, **Gruppe E**) führte zu einer signifikanten Minderung dieses cholestatischen Effekts um mehr als die Hälfte (siehe **Tabelle 5** und **Abb. 10**).

Tabelle 5: Gallenfluß bei Gabe von TLCA ± Wortmannin (MW ± SD). Relativer Gallenfluß: min 45 = 100 %. * p < 0,01 (vs. Gruppe C).

Gruppe	C (TLCA, n = 6)		D (Wortmannin 100 nM + TLCA, n = 6)		E (Wortmannin 500 nM + TLCA, n = 5)	
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)
20	1,12 ± 0,14	121 ± 23	1,13 ± 0,10	113 ± 9	1,11 ± 0,18	108 ± 12
25	1,00 ± 0,13	107 ± 11	0,96 ± 0,14	95 ± 11	0,93 ± 0,14	91 ± 10
30	1,13 ± 0,11	121 ± 9	1,13 ± 0,14	113 ± 10	1,08 ± 0,12	105 ± 10
35	1,03 ± 0,09	111 ± 8	1,05 ± 0,11	104 ± 6	1,09 ± 0,13	106 ± 7
40	0,98 ± 0,11	105 ± 3	1,03 ± 0,09	103 ± 3	1,06 ± 0,15	103 ± 7
45	0,93 ± 0,11	100 ± 0	1,00 ± 0,08	100 ± 0	1,03 ± 0,13	100 ± 0
50	0,75 ± 0,09	80 ± 9	0,81 ± 0,08	81 ± 6	0,78 ± 0,09	77 ± 12
55	0,30 ± 0,08	32 ± 6	0,50 ± 0,05	50 ± 2	0,50 ± 0,08	49 ± 8
60	0,10 ± 0,04	10 ± 4	0,55 ± 0,10	55 ± 6	0,55 ± 0,07	54 ± 5
65	0,07 ± 0,04	8 ± 5	0,56 ± 0,11	55 ± 8	0,57 ± 0,08	56 ± 6
70	0,08 ± 0,04	9 ± 5	0,55 ± 0,10	55 ± 7	0,54 ± 0,09	52 ± 6
75	0,12 ± 0,05	13 ± 5	0,54 ± 0,09	53 ± 6	0,48 ± 0,09	46 ± 6
80	0,13 ± 0,05	14 ± 6	0,51 ± 0,07	51 ± 6	0,44 ± 0,08	43 ± 7
85	0,13 ± 0,05	14 ± 7	0,47 ± 0,06	47 ± 7	0,38 ± 0,08	37 ± 7
90	0,13 ± 0,04	14 ± 5	0,41 ± 0,05	41 ± 7	0,32 ± 0,08	32 ± 8
95	0,11 ± 0,03	12 ± 5	0,36 ± 0,06	36 ± 8	0,33 ± 0,05	33 ± 7
Gallenfluß	9,54 ± 1,59 µl/(g x 50 min)	1033 ± 206 A.E./50 min	26,24 ± 2,98 µl/(g x 50 min) *	2621 ± 197 A.E./50 min *	24,55 ± 3,49 µl/(g x 50 min) *	2395 ± 299 A.E./50 min *

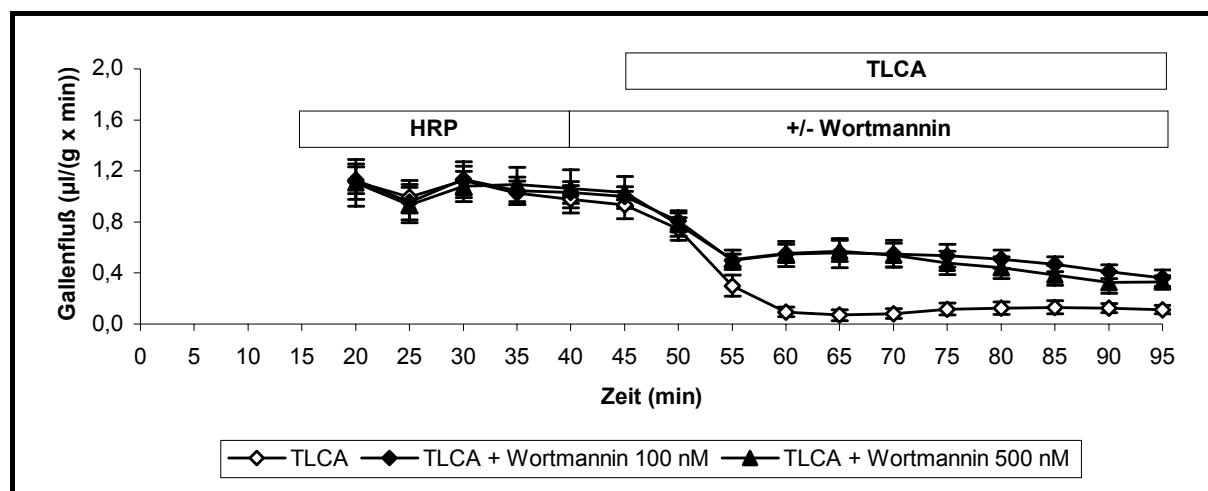


Abb. 10: Gallenfluß bei Gabe von TLCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5 – 6).

3.1.1.3 Effekt von TUDCA

Die Zugabe der hydrophilen Gallensäure TUDCA ab der 45. min führte in beiden Gruppen (**Gruppen F und G**) zu einer Steigerung des Gallenflusses um etwa 50 % im Vergleich mit den Ausgangswerten.

Die Zugabe von Wortmannin führte zu keiner signifikanten Beeinflussung des Gallenflusses (siehe **Tabelle 6** und **Abb. 11**).

Tabelle 6: Gallenfluß bei Gabe von TUDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Relativer Gallenfluß: min 45 = 100 %.

Gruppe	F (TUDCA, n = 5)		G (Wortmannin 100 nM + TUDCA, n = 5)	
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)
20	1,23 ± 0,17	132 ± 22	1,25 ± 0,22	120 ± 11
25	0,95 ± 0,26	103 ± 34	1,02 ± 0,34	97 ± 21
30	1,11 ± 0,21	119 ± 29	1,20 ± 0,23	115 ± 8
35	1,04 ± 0,15	112 ± 22	1,14 ± 0,18	109 ± 6
40	0,99 ± 0,08	106 ± 9	1,09 ± 0,17	104 ± 4
45	0,94 ± 0,11	100 ± 0	1,04 ± 0,14	100 ± 0
50	1,11 ± 0,22	118 ± 17	1,19 ± 0,20	114 ± 6
55	1,44 ± 0,33	152 ± 20	1,48 ± 0,25	142 ± 9
60	1,51 ± 0,33	160 ± 20	1,54 ± 0,32	147 ± 14
65	1,52 ± 0,34	160 ± 19	1,58 ± 0,33	150 ± 15
70	1,51 ± 0,33	159 ± 19	1,55 ± 0,35	147 ± 17
75	1,50 ± 0,34	158 ± 20	1,54 ± 0,34	146 ± 16
80	1,50 ± 0,34	158 ± 20	1,52 ± 0,31	145 ± 14
85	1,49 ± 0,32	157 ± 18	1,47 ± 0,30	140 ± 13
90	1,48 ± 0,36	156 ± 20	1,47 ± 0,27	140 ± 13
95	1,48 ± 0,33	156 ± 18	1,42 ± 0,24	136 ± 9
Gallenfluß	72,65 ± 16,10 µl/(g x 50 min)	7676 ± 920 A.E./50 min	73,73 ± 14,41 µl/(g x 50 min)	7046 ± 578 A.E./50 min

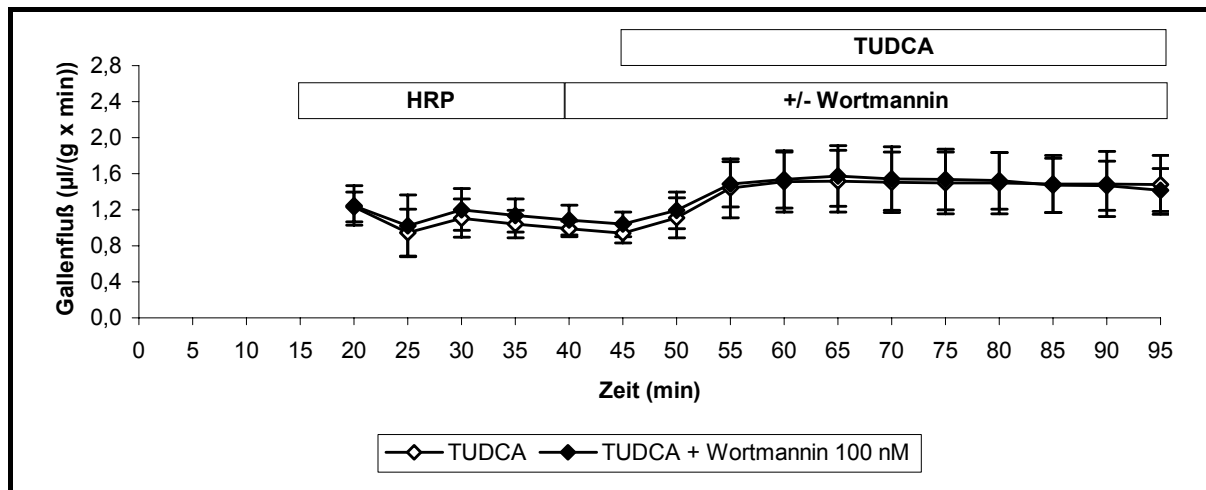


Abb. 11: Gallenfluß bei Gabe von TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.1.1.4 Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA

Bei gemeinsamer Verabreichung von TLCA und TUDCA (**Gruppe H**) kam es zur vollständigen Aufhebung des in **3.1.1.2** beschriebenen cholestatischen Effekts von TLCA (**Gruppe C**).

Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe I**) führte zu einer weiteren signifikanten Steigerung des Gallenflusses (siehe **Tabelle 7** und **Abb. 12**).

Tabelle 7: Gallenfluß bei Gabe von TLCA und TUDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Relativer Gallenfluß: min 45 = 100 %. * p < 0,01 (vs. Gruppe H), ** p = 0,01 (vs. Gruppe H).

Gruppe	H (TLCA + TUDCA, n = 5)		I (Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA, n = 5)	
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)
20	1,30 ± 0,21	130 ± 11	1,18 ± 0,12	130 ± 13
25	1,03 ± 0,18	103 ± 11	0,91 ± 0,19	99 ± 16
30	1,23 ± 0,18	123 ± 8	1,11 ± 0,15	121 ± 9
35	1,11 ± 0,16	110 ± 8	1,02 ± 0,11	112 ± 4
40	1,00 ± 0,15	99 ± 8	0,94 ± 0,08	103 ± 3
45	1,00 ± 0,11	100 ± 0	0,91 ± 0,06	100 ± 0
50	1,16 ± 0,17	117 ± 22	1,15 ± 0,18	126 ± 19
55	1,22 ± 0,28	125 ± 37	1,50 ± 0,19	164 ± 15
60	1,12 ± 0,32	114 ± 41	1,63 ± 0,20	179 ± 16
65	1,10 ± 0,26	113 ± 36	1,72 ± 0,21	189 ± 22
70	1,12 ± 0,26	115 ± 37	1,79 ± 0,23	197 ± 24
75	1,15 ± 0,24	117 ± 36	1,81 ± 0,22	199 ± 24
80	1,16 ± 0,26	118 ± 37	1,83 ± 0,20	201 ± 23
85	1,16 ± 0,27	119 ± 38	1,79 ± 0,27	197 ± 31
90	1,15 ± 0,27	118 ± 38	1,78 ± 0,25	197 ± 30
95	1,14 ± 0,29	117 ± 40	1,79 ± 0,24	197 ± 31
Gallenfluß	57,42 ± 12,78 µl/(g x 50 min)	5868 ± 1799 A.E./50 min	83,90 ± 10,32 µl/(g x 50 min) *	9233 ± 1121 A.E./50 min **

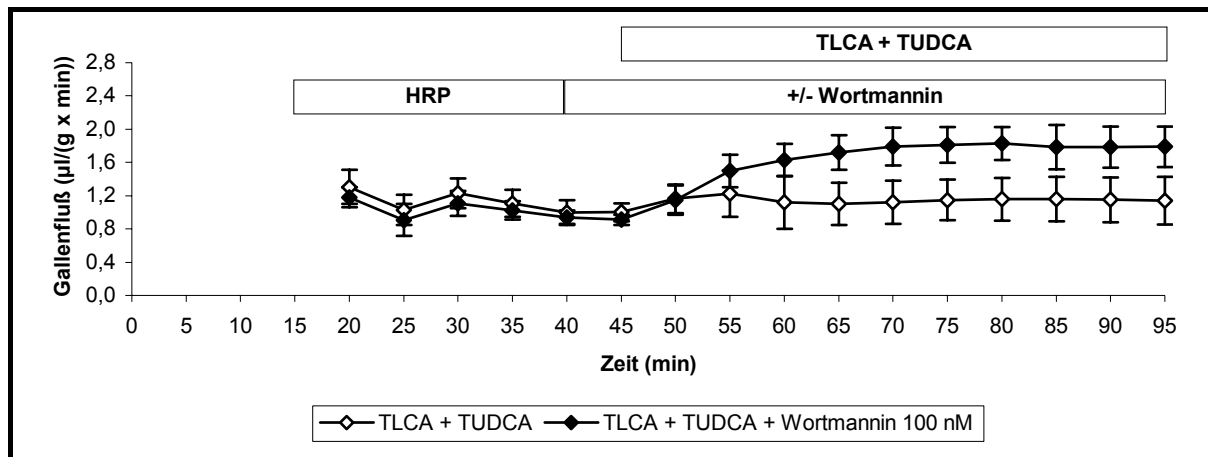


Abb. 12: Gallenfluß bei Gabe von TLCA und TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.1.1.5 Effekt von TCDCA

Nach Applikation von TCDCA (**Gruppe J**) kam es zu einem allmählichen Absinken des Gallenflusses. Im Vergleich zu der ebenfalls cholestatisch wirkenden Gallensäure TLCA (**Gruppe C**, siehe 3.1.1.2) war diese Abnahme jedoch trotz höherer Gallensäurenkonzentration (25 vs. 10 µM) weniger ausgeprägt.

Die zusätzliche Infusion von Wortmannin zeigte keine signifikante Veränderung des Gallenflusses (siehe **Tabelle 8** und **Abb. 13**).

Tabelle 8: Gallenfluß bei Gabe von TCDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Relativer Gallenfluß: min 45 = 100 %.				
Gruppe	J (TCDCA, n = 5)		K (Wortmannin 100 nM + TCDCA, n = 5)	
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Relativer Gallenfluß (%)
20	1,18 ± 0,19	126 ± 11	1,03 ± 0,22	102 ± 21
25	1,00 ± 0,22	106 ± 15	0,97 ± 0,16	96 ± 12
30	1,26 ± 0,27	134 ± 22	1,11 ± 0,16	110 ± 12
35	1,13 ± 0,21	120 ± 15	1,08 ± 0,12	107 ± 9
40	1,02 ± 0,15	109 ± 8	1,04 ± 0,10	103 ± 6
45	0,94 ± 0,11	100 ± 0	1,01 ± 0,07	100 ± 0
50	1,15 ± 0,22	123 ± 14	1,04 ± 0,28	103 ± 19
55	1,10 ± 0,28	117 ± 21	0,99 ± 0,34	97 ± 29
60	1,01 ± 0,33	107 ± 28	0,96 ± 0,36	94 ± 31
65	0,96 ± 0,30	102 ± 26	0,86 ± 0,40	84 ± 36
70	0,86 ± 0,27	91 ± 25	0,73 ± 0,39	71 ± 34
75	0,80 ± 0,27	84 ± 26	0,61 ± 0,39	60 ± 36
80	0,77 ± 0,30	81 ± 29	0,55 ± 0,35	53 ± 32
85	0,77 ± 0,33	81 ± 32	0,49 ± 0,30	48 ± 28
90	0,77 ± 0,35	81 ± 34	0,48 ± 0,32	46 ± 29
95	0,75 ± 0,35	78 ± 35	0,38 ± 0,23	38 ± 23
Gallenfluß	44,74 ± 14,37 µl/(g x 50 min)	4723 ± 1281 A.E./50 min	35,39 ± 16,03 µl/(g x 50 min)	3467 ± 1389 A.E./50 min

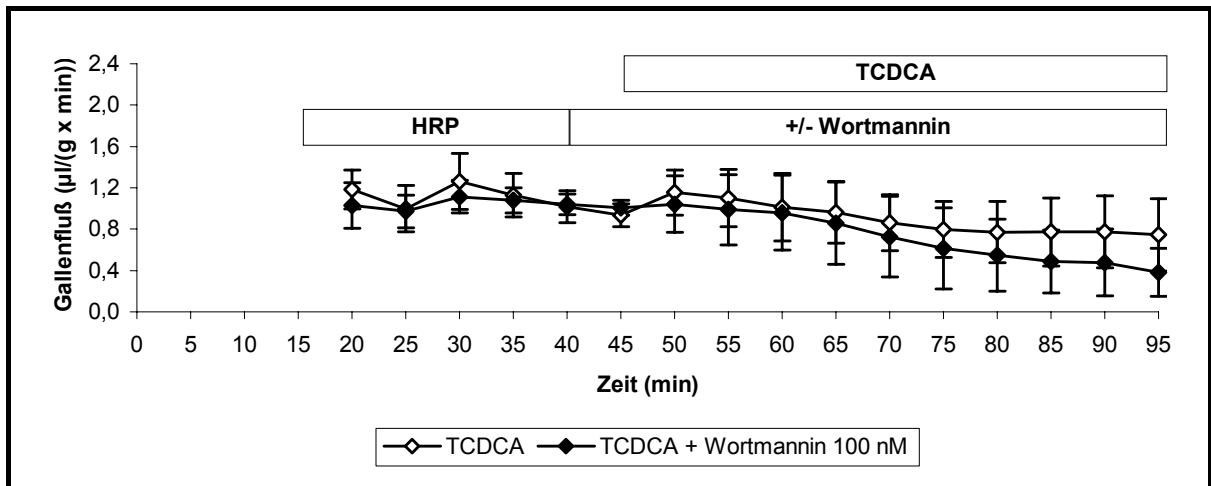


Abb. 13: Gallenfluß bei Gabe von TCDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.1.1.6 Modulation des Gallenflusses: Zusammenfassung

Die durch TLCA induzierte Hemmung des Gallenflusses wurde durch Wortmannin antagonisiert. Dagegen wurde die durch TUDCA induzierte Choleresese nach Hemmung der PI₃-Kinasen nicht beeinflusst. TUDCA und Wortmannin wirkten additiv den TLCA-Effekten auf den Gallenfluß entgegen (siehe **Abb. 14**).

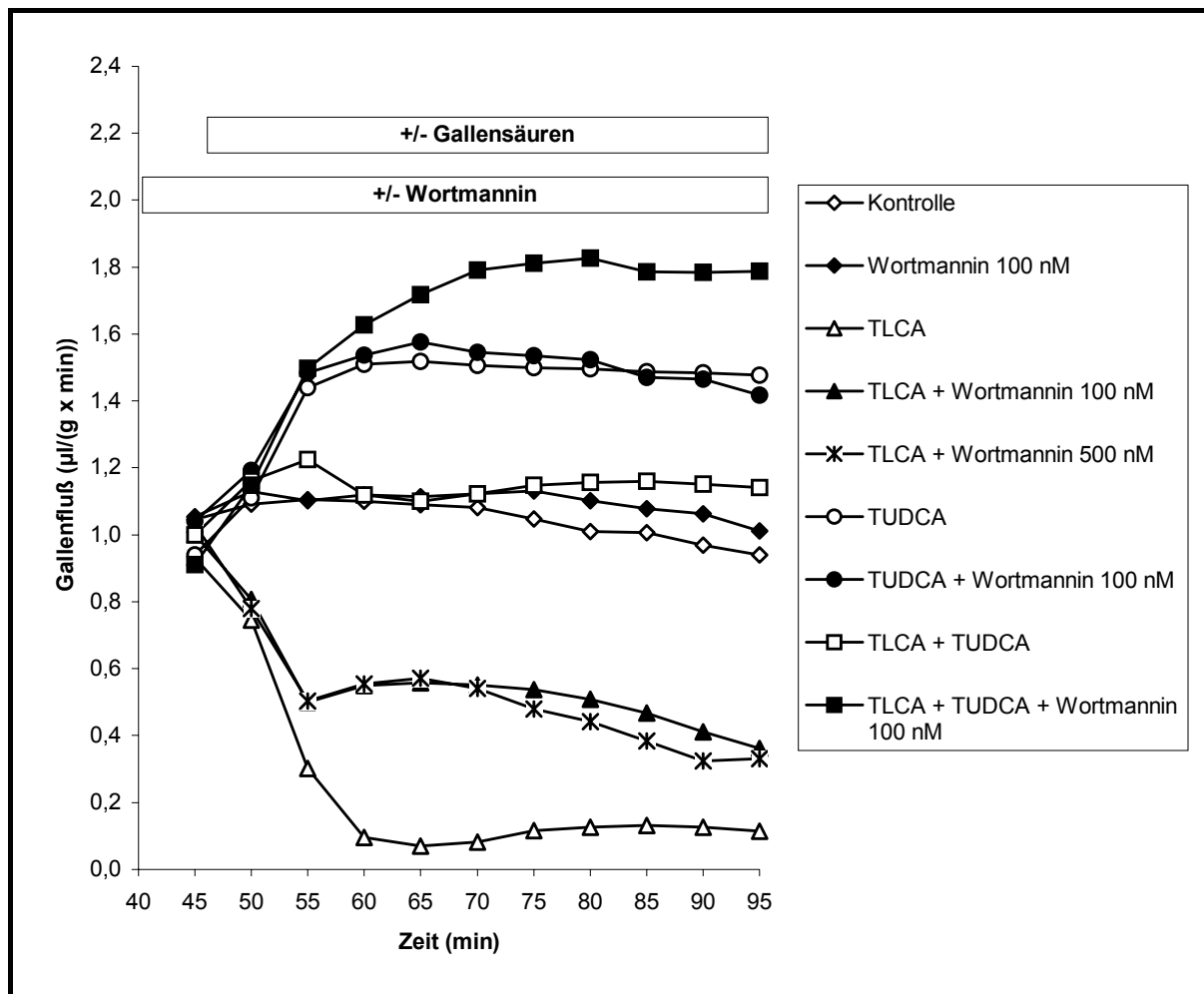


Abb. 14: Modulation des Gallenflusses (MW, n = 5 – 6).

3.1.2 Biliäre Sekretion der HRP

3.1.2.1 Effekt von Wortmannin

Bei den unbehandelten Kontrollen (**Gruppe A**) stieg die hepatobiliäre Sekretion der HRP während der Vorbeladungsphase allmählich an. Sie erreichte nach 50 min ein Maximum und fiel danach wieder ab.

Die Zugabe von Wortmannin (**Gruppe B**) führte zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion von HRP über den gesamten Untersuchungszeitraum (siehe **Tabelle 9** und **Abb. 15**).

Tabelle 9: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Kontrollen ± Wortmannin (MW ± SD). Relative HRP-Sekretion: min 45 = 100 %. * p < 0,05 (vs. Gruppe A), ** p = 0,01 (vs. Gruppe A).

Gruppe	A (Kontrolle, n = 5)		B (Wortmannin 100 nM, n = 5)	
Zeit (min)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)
20	0,06 ± 0,06	7 ± 7	0,08 ± 0,04	9 ± 6
25	0,10 ± 0,10	11 ± 7	0,07 ± 0,04	9 ± 5
30	0,22 ± 0,18	24 ± 15	0,20 ± 0,09	23 ± 10
35	0,35 ± 0,21	39 ± 16	0,40 ± 0,11	47 ± 12
40	0,56 ± 0,27	64 ± 23	0,65 ± 0,18	76 ± 14
45	0,86 ± 0,21	100 ± 0	0,84 ± 0,12	100 ± 0
50	0,95 ± 0,19	112 ± 9	1,07 ± 0,16	127 ± 11
55	0,82 ± 0,28	95 ± 15	1,16 ± 0,23	139 ± 30
60	0,75 ± 0,31	85 ± 21	1,10 ± 0,31	134 ± 45
65	0,51 ± 0,34	56 ± 27	0,99 ± 0,36	120 ± 44
70	0,29 ± 0,28	31 ± 25	0,88 ± 0,35	105 ± 37
75	0,20 ± 0,19	21 ± 16	0,61 ± 0,32	72 ± 33
80	0,14 ± 0,12	15 ± 11	0,38 ± 0,18	47 ± 24
85	0,07 ± 0,04	8 ± 3	0,27 ± 0,13	34 ± 17
90	0,11 ± 0,09	12 ± 8	0,27 ± 0,12	34 ± 18
95	0,07 ± 0,06	9 ± 8	0,22 ± 0,09	28 ± 14
HRP-Sekretion	19,51 ± 8,96 ng/(g x 50 min)	2214 ± 626 A.E./50 min	34,73 ± 8,14 ng/(g x 50 min) *	4201 ± 1081 A.E./50 min **

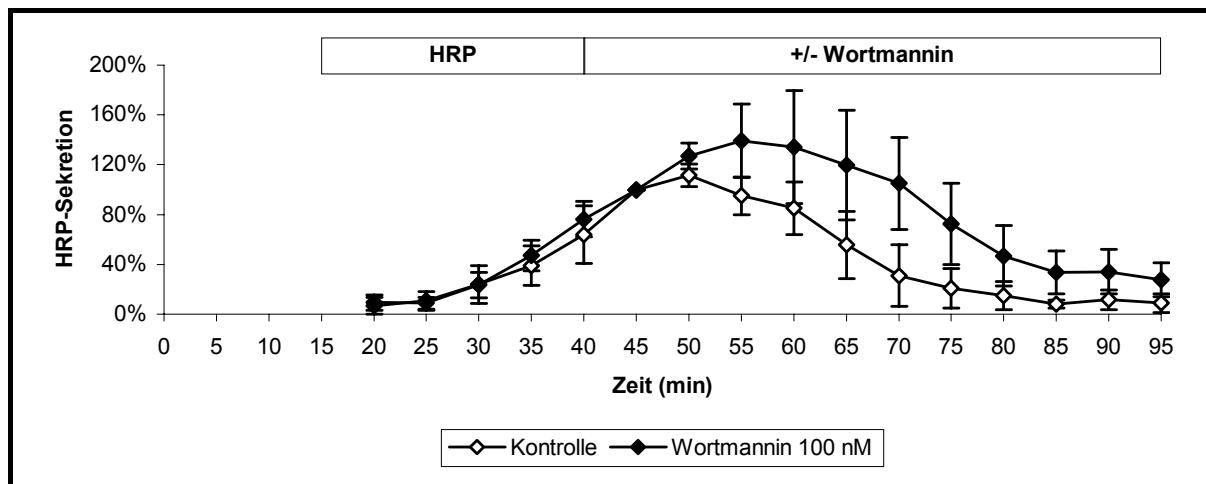


Abb. 15: Hepatobiliäre HRP-Sekretion in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5, % gegenüber 45. min).

3.1.2.2 Effekt von TLCA

Nach Zugabe von TLCA (**Gruppe C**) kam es zu einem raschen Versiegen der hepatobiliären HRP-Sekretion.

Die zusätzliche Infusion von Wortmannin (100 nM, **Gruppe D**) führte zu einer Erhöhung der hepatobiliären HRP-Sekretion auf mehr als das Doppelte.

Eine Erhöhung der Wortmanninkonzentration auf 500 nM (**Gruppe E**) hatte eine vollständige Aufhebung der TLCA-Wirkung zur Folge (siehe **Tabelle 10** und **Abb. 16**).

Tabelle 10: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TLCA ± Wortmannin (MW ± SD). Relative HRP-Sekretion: min 45 = 100 %. * p < 0,01 (vs. Gruppe C), ** p = 0,01 (vs. Gruppe C), # p < 0,05 (Gruppe D vs. Gruppe E).

Gruppe	C (TLCA, n = 6)		D (Wortmannin 100 nM + TLCA, n = 6)		E (Wortmannin 500 nM + TLCA, n = 5)	
Zeit (min)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)
20	0,08 ± 0,06	12 ± 9	0,02 ± 0,02	2 ± 3	0,07 ± 0,04	15 ± 11
25	0,09 ± 0,02	12 ± 4	0,12 ± 0,10	12 ± 9	0,06 ± 0,02	18 ± 15
30	0,35 ± 0,23	44 ± 18	0,31 ± 0,22	31 ± 19	0,07 ± 0,04	23 ± 24
35	0,50 ± 0,28	64 ± 15	0,50 ± 0,24	49 ± 19	0,18 ± 0,08	48 ± 33
40	0,63 ± 0,25	83 ± 8	0,89 ± 0,27	85 ± 6	0,31 ± 0,12	76 ± 17
45	0,76 ± 0,29	100 ± 0	1,05 ± 0,30	100 ± 0	0,43 ± 0,22	100 ± 0
50	0,62 ± 0,26	83 ± 16	0,92 ± 0,33	85 ± 10	0,49 ± 0,21	120 ± 19
55	0,27 ± 0,10	39 ± 22	0,56 ± 0,21	53 ± 9	0,41 ± 0,11	109 ± 38
60	0,08 ± 0,05	11 ± 9	0,65 ± 0,20	63 ± 12	0,50 ± 0,14	137 ± 64
65	0,06 ± 0,05	8 ± 7	0,58 ± 0,18	56 ± 15	0,51 ± 0,18	138 ± 66
70	0,05 ± 0,04	7 ± 5	0,53 ± 0,16	51 ± 11	0,49 ± 0,17	132 ± 59
75	0,06 ± 0,03	9 ± 4	0,42 ± 0,12	41 ± 8	0,39 ± 0,11	108 ± 54
80	0,09 ± 0,04	12 ± 7	0,30 ± 0,06	30 ± 7	0,31 ± 0,08	86 ± 42
85	0,05 ± 0,04	6 ± 3	0,20 ± 0,05	21 ± 11	0,22 ± 0,04	62 ± 35
90	0,04 ± 0,03	5 ± 3	0,16 ± 0,05	16 ± 4	0,14 ± 0,06	41 ± 32
95	0,02 ± 0,01	3 ± 2	0,10 ± 0,02	10 ± 3	0,14 ± 0,12	37 ± 32
HRP-Sekretion	6,67 ± 2,32 ng/(g x 50 min)	908 ± 258 A.E./50 min	22,10 ± 6,00 ng/(g x 50 min) *	2133 ± 285 A.E./50 min *	18,02 ± 5,45 ng/(g x 50 min) *	4846 ± 2144 A.E./50 min ** #

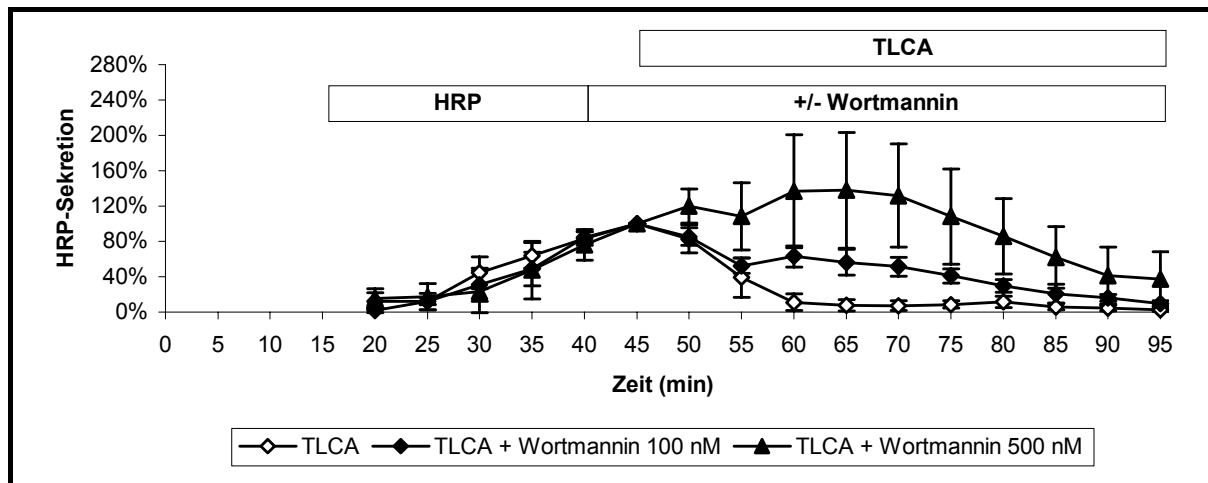


Abb. 16: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TLCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5 – 6, % gegenüber 45. min).

3.1.2.3 Effekt von TUDCA

Die hepatobiliäre HRP-Sekretion war nach Gabe von TUDCA (**Gruppe F**) höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe (**Gruppe A**, siehe 3.1.2.1).

Die Infusion von Wortmannin (**Gruppe G**) führte tendenziell zwar zu einer stärkeren HRP-Sekretion als in **Gruppe F**, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (siehe **Tabelle 11** und **Abb. 17**).

Tabelle 11: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TUDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Relative HRP-Sekretion: min 45 = 100 %.

Gruppe	F (TUDCA, n = 5)		G (Wortmannin 100 nM + TUDCA, n = 5)	
	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)
20	0,09 ± 0,05	11 ± 6	0,04 ± 0,07	6 ± 9
25	0,09 ± 0,03	12 ± 5	0,02 ± 0,03	3 ± 4
30	0,27 ± 0,22	26 ± 14	0,12 ± 0,09	17 ± 11
35	0,46 ± 0,34	46 ± 24	0,24 ± 0,12	34 ± 15
40	0,72 ± 0,45	76 ± 14	0,47 ± 0,09	67 ± 10
45	0,90 ± 0,50	100 ± 0	0,69 ± 0,11	100 ± 0
50	1,06 ± 0,49	126 ± 35	0,99 ± 0,16	143 ± 10
55	1,01 ± 0,39	130 ± 68	1,12 ± 0,15	163 ± 25
60	0,80 ± 0,21	110 ± 64	1,19 ± 0,12	175 ± 26
65	0,50 ± 0,13	70 ± 43	0,99 ± 0,09	145 ± 22
70	0,31 ± 0,12	43 ± 27	0,60 ± 0,11	88 ± 14
75	0,22 ± 0,11	29 ± 18	0,36 ± 0,09	53 ± 14
80	0,16 ± 0,11	18 ± 7	0,28 ± 0,04	41 ± 12
85	0,14 ± 0,11	17 ± 10	0,18 ± 0,06	27 ± 12
90	0,16 ± 0,13	19 ± 10	0,17 ± 0,04	25 ± 3
95	0,09 ± 0,09	10 ± 6	0,18 ± 0,03	26 ± 4
HRP-Sekretion	22,29 ± 8,59 ng/(g x 50 min)	2857 ± 1330 A.E./50 min	30,26 ± 2,99 ng/(g x 50 min)	4426 ± 568 A.E./50 min

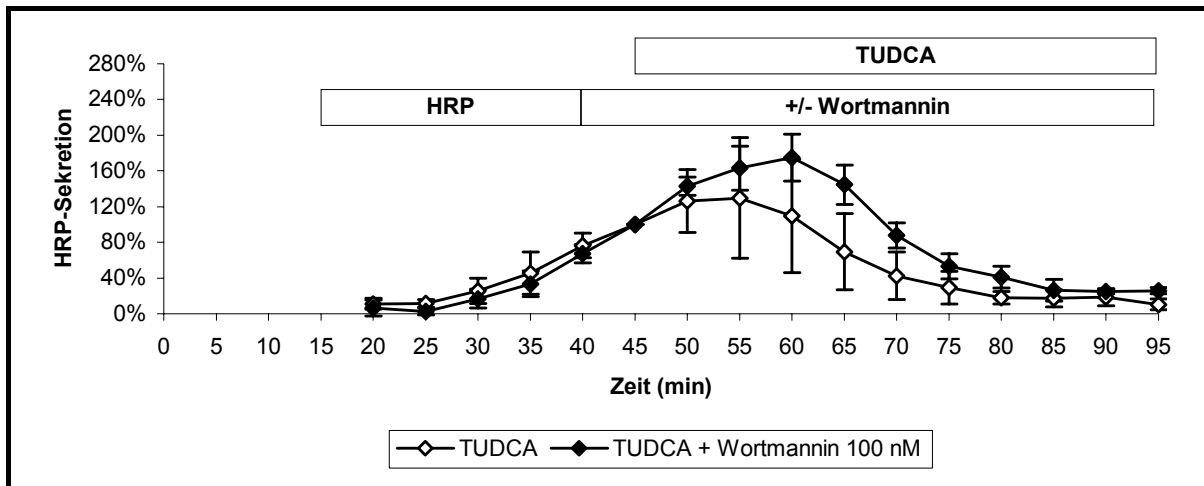


Abb. 17: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW \pm SD, n = 5, % gegenüber 45. min).

3.1.2.4 Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA

Die zusätzliche Verabreichung von TUDCA zu TLCA (**Gruppe H**) führte zu einer vollständigen Aufhebung der hemmenden Wirkung von TLCA auf die Sekretion von HRP.

Wortmannin (**Gruppe I**) führte zu einer weiteren signifikanten Steigerung der hepatobiliären Exozytose (siehe **Tabelle 12** und **Abb. 18**).

Tabelle 12: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TLCA und TUDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Relative HRP-Sekretion: min 45 = 100 %. * p < 0,05 (vs. Gruppe H).

Gruppe	H (TLCA + TUDCA, n = 5)		I (Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA, n = 5)	
Zeit (min)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)
20	0,05 ± 0,03	4 ± 4	0,03 ± 0,06	3 ± 4
25	0,19 ± 0,14	13 ± 6	0,11 ± 0,13	8 ± 8
30	0,46 ± 0,31	33 ± 14	0,42 ± 0,34	35 ± 17
35	0,69 ± 0,29	52 ± 9	0,70 ± 0,44	61 ± 16
40	0,93 ± 0,31	71 ± 5	0,90 ± 0,43	83 ± 7
45	1,32 ± 0,46	100 ± 0	1,06 ± 0,42	100 ± 0
50	1,54 ± 0,60	116 ± 19	1,41 ± 0,45	137 ± 19
55	1,50 ± 0,66	110 ± 22	1,53 ± 0,50	149 ± 21
60	1,39 ± 0,64	103 ± 21	1,53 ± 0,31	153 ± 31
65	1,00 ± 0,46	75 ± 14	1,37 ± 0,18	141 ± 40
70	0,72 ± 0,36	56 ± 18	1,09 ± 0,29	112 ± 42
75	0,53 ± 0,21	41 ± 15	0,79 ± 0,19	83 ± 34
80	0,36 ± 0,11	28 ± 8	0,52 ± 0,13	56 ± 26
85	0,31 ± 0,11	24 ± 8	0,45 ± 0,12	47 ± 24
90	0,26 ± 0,08	20 ± 7	0,35 ± 0,09	38 ± 20
95	0,22 ± 0,09	18 ± 8	0,30 ± 0,08	31 ± 13
HRP-Sekretion	39,13 ± 15,41 ng/(g x 50 min)	2957 ± 545 A.E./50 min	46,62 ± 8,90 ng/(g x 50 min)	4732 ± 1248 A.E./50 min *

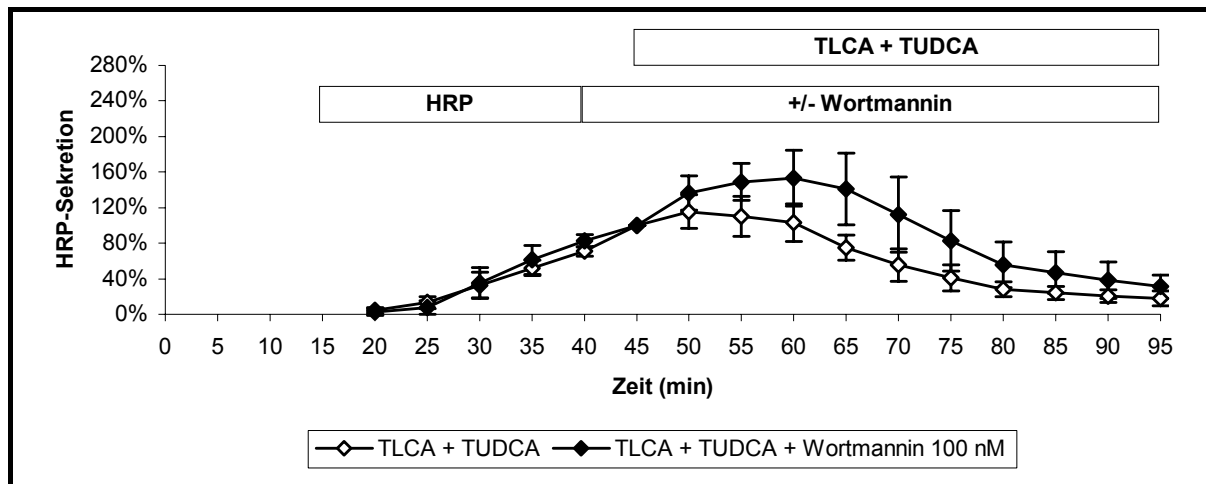


Abb. 18: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TLCA und TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5, % gegenüber 45. min).

3.1.2.5 Effekt von TCDCA

Bei beiden TCDCA-Gruppen (**Gruppen J und K**) kam es zu einer gleichmäßigen Zu- und Abnahme der hepatobiliären HRP-Sekretion.

Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe K**) führte mit 3709 ± 1230 A.E./50 min vs. 3893 ± 1669 A.E./50 min zu keiner signifikanten Veränderung der HRP-Sekretion (siehe **Tabelle 13** und **Abb. 19**).

Tabelle 13: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TCDCA \pm Wortmannin (MW \pm SD). Relative HRP-Sekretion: min 45 = 100 %.

Gruppe	J (TCDCA, n = 5)		K (Wortmannin 100 nM + TCDCA, n = 5)	
Zeit (min)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)	HRP-Sekretion (ng/(g x min))	Relative HRP-Sekretion (%)
20	0,04 \pm 0,04	7 \pm 7	0,05 \pm 0,05	6 \pm 6
25	0,04 \pm 0,03	6 \pm 5	0,15 \pm 0,16	19 \pm 16
30	0,14 \pm 0,08	17 \pm 6	0,18 \pm 0,14	24 \pm 13
35	0,28 \pm 0,21	33 \pm 13	0,29 \pm 0,09	42 \pm 10
40	0,60 \pm 0,31	74 \pm 15	0,48 \pm 0,18	67 \pm 9
45	0,79 \pm 0,30	100 \pm 0	0,71 \pm 0,18	100 \pm 0
50	1,29 \pm 0,44	170 \pm 45	1,07 \pm 0,52	146 \pm 33
55	1,56 \pm 0,59	210 \pm 78	1,25 \pm 0,49	174 \pm 33
60	1,17 \pm 0,51	162 \pm 76	1,11 \pm 0,48	156 \pm 53
65	0,74 \pm 0,40	107 \pm 63	0,80 \pm 0,43	114 \pm 57
70	0,39 \pm 0,24	57 \pm 37	0,47 \pm 0,26	65 \pm 33
75	0,20 \pm 0,13	29 \pm 19	0,29 \pm 0,21	43 \pm 36
80	0,13 \pm 0,09	19 \pm 13	0,13 \pm 0,07	19 \pm 13
85	0,08 \pm 0,05	11 \pm 8	0,08 \pm 0,06	12 \pm 11
90	0,04 \pm 0,06	6 \pm 8	0,06 \pm 0,04	8 \pm 6
95	0,06 \pm 0,03	9 \pm 5	0,03 \pm 0,03	5 \pm 5
HRP-Sekretion	28,33 \pm 10,96 ng/(g x 50 min)	3893 \pm 1669 A.E./50 min	26,37 \pm 11,51 ng/(g x 50 min)	3709 \pm 1230 A.E./50 min

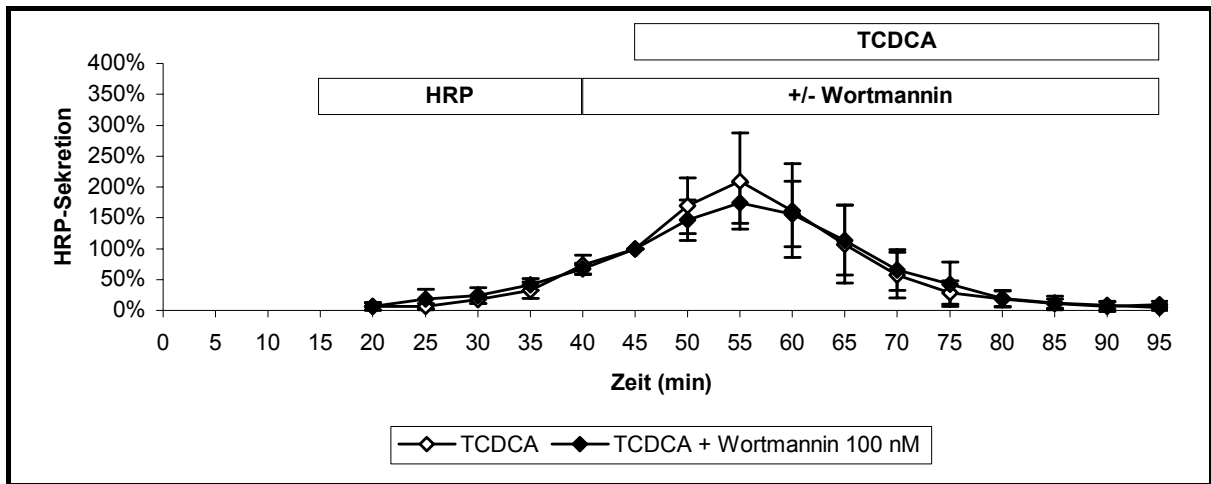


Abb. 19: Hepatobiliäre HRP-Sekretion bei Gabe von TCDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5, % gegenüber 45. min).

3.1.2.6 Modulation der hepatobiliären HRP-Sekretion: Zusammenfassung

Die durch TLCA induzierte Hemmung der biliären Exozytose wurde durch Wortmannin antagonisiert. Dagegen wurden die durch TUDCA induzierte Steigerung nach Hemmung der PI_3 -Kinasen nicht beeinflusst. TUDCA und Wortmannin wirkten additiv den TLCA-Effekten auf die hepatobiliäre Exozytose entgegen (siehe **Abb. 20**).

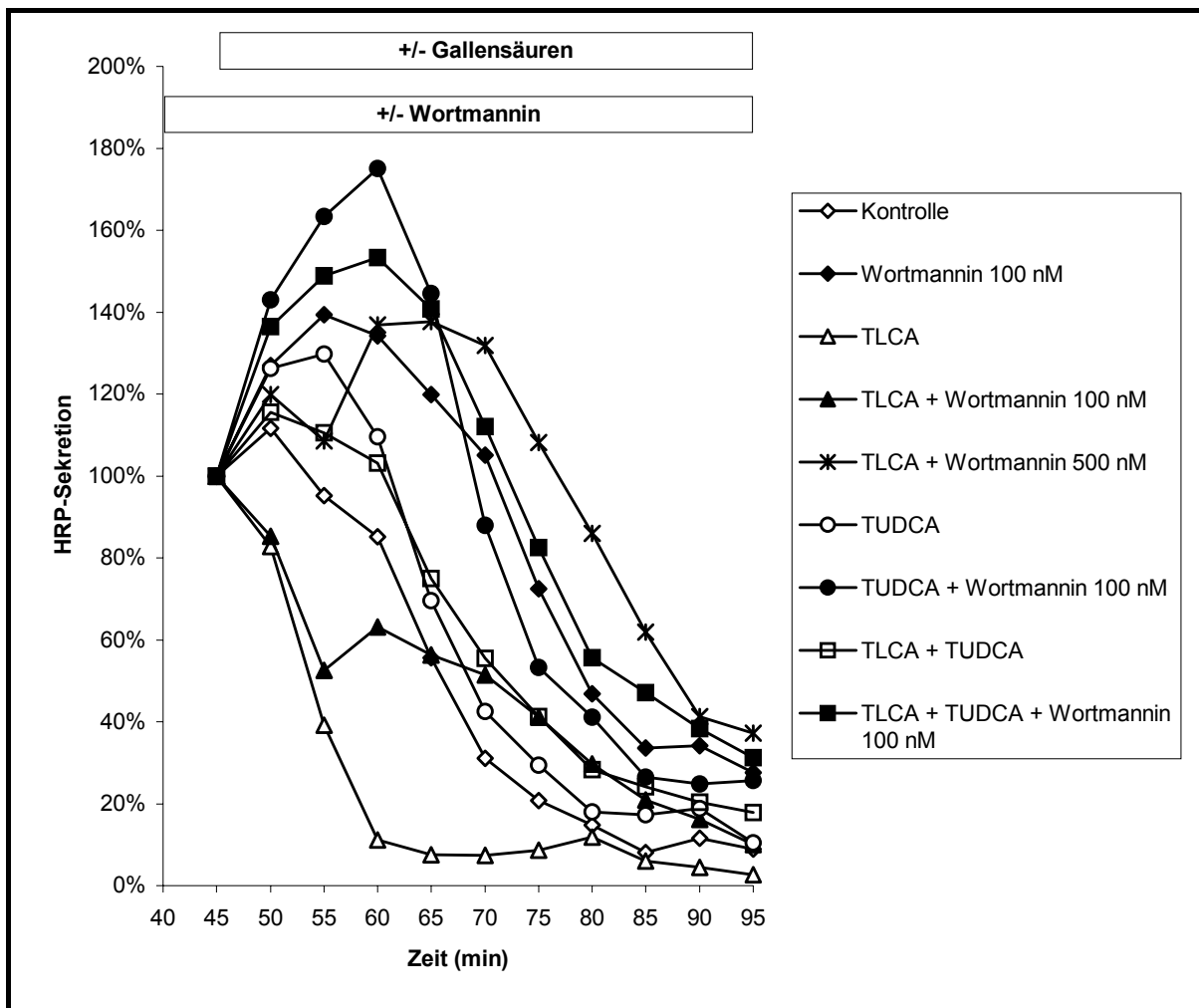


Abb. 20: Modulation der hepatobiliären HRP-Sekretion (MW, n = 5 – 6, % gegenüber 45. min).

3.1.3 Aktivität der LDH

Die mittlere LDH-Aktivität nahm bei den meisten Versuchen während der Perfusion leicht zu.

Bei Gabe von TLCA und TUDCA (**Gruppe H**) kam es zu einem deutlichen LDH-Anstieg von $3,6 \pm 2,0$ mU/(g Leber x min) (45. min) auf $40,3 \pm 22,4$ mU/(g Leber x min) (65. min) und $58,3 \pm 15,7$ mU/(g Leber x min) (85. min). Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe I**) führte zu einer signifikanten Verringerung der Leberzellschädigung mit $6,1 \pm 3,4$ mU/(g Leber x min) (65. min) und $11,7 \pm 10,3$ mU/(g Leber x min) (85. min).

Der stärkste Anstieg der mittleren LDH-Aktivität fiel in **Gruppe K** (Wortmannin 100 nM + TCDCA) auf. Er war mehr als doppelt so hoch wie bei TCDCA alleine (**Gruppe J**) (siehe **Tabelle 14** und **Abb. 21**).

Gruppe	LDH-Aktivität (mU/(g x min))		
	45 min	65 min	85 min
A: Kontrolle, n = 5.	$3,8 \pm 2,0$	$5,4 \pm 1,5$	$9,5 \pm 3,0$
B: Wortmannin 100 nM, n = 5.	$7,5 \pm 2,6$ p < 0,05 (vs. Gruppe A)	$6,1 \pm 3,7$	$7,6 \pm 3,6$
C: TLCA, n = 6.	$3,6 \pm 2,3$	$5,8 \pm 1,7$	$18,7 \pm 10,2$
D: Wortmannin 100 nM + TLCA, n = 6.	$2,9 \pm 2,4$	$5,2 \pm 1,8$	$15,4 \pm 20,2$
E: Wortmannin 500 nM + TLCA, n = 5.	$14,6 \pm 8,4$ p < 0,05 (vs. Gruppe C und vs. Gruppe D)	$12,7 \pm 6,7$	$11,4 \pm 2,5$
F: TUDCA, n = 5.	$5,8 \pm 2,0$	$7,5 \pm 1,8$	$11,4 \pm 4,1$
G: Wortmannin 100 nM + TUDCA, n = 5.	$7,9 \pm 4,3$	$6,6 \pm 4,1$	$10,0 \pm 5,3$
H: TLCA + TUDCA, n = 5.	$3,6 \pm 2,0$	$40,3 \pm 22,4$	$58,3 \pm 15,7$
I: Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA, n = 5.	$4,3 \pm 1,3$	$6,1 \pm 3,4$ p < 0,05 (vs. Gruppe H)	$11,7 \pm 10,3$ p < 0,01 (vs. Gruppe H)
J: TCDCA, n = 5.	$12,7 \pm 17,6$	$30,3 \pm 18,6$	$64,1 \pm 26,9$
K: Wortmannin 100 nM + TCDCA, n = 5.	$8,7 \pm 11,0$	$87,6 \pm 45,4$ p = 0,05 (vs. Gruppe J)	$140,5 \pm 50,7$ p < 0,05 (vs. Gruppe J)

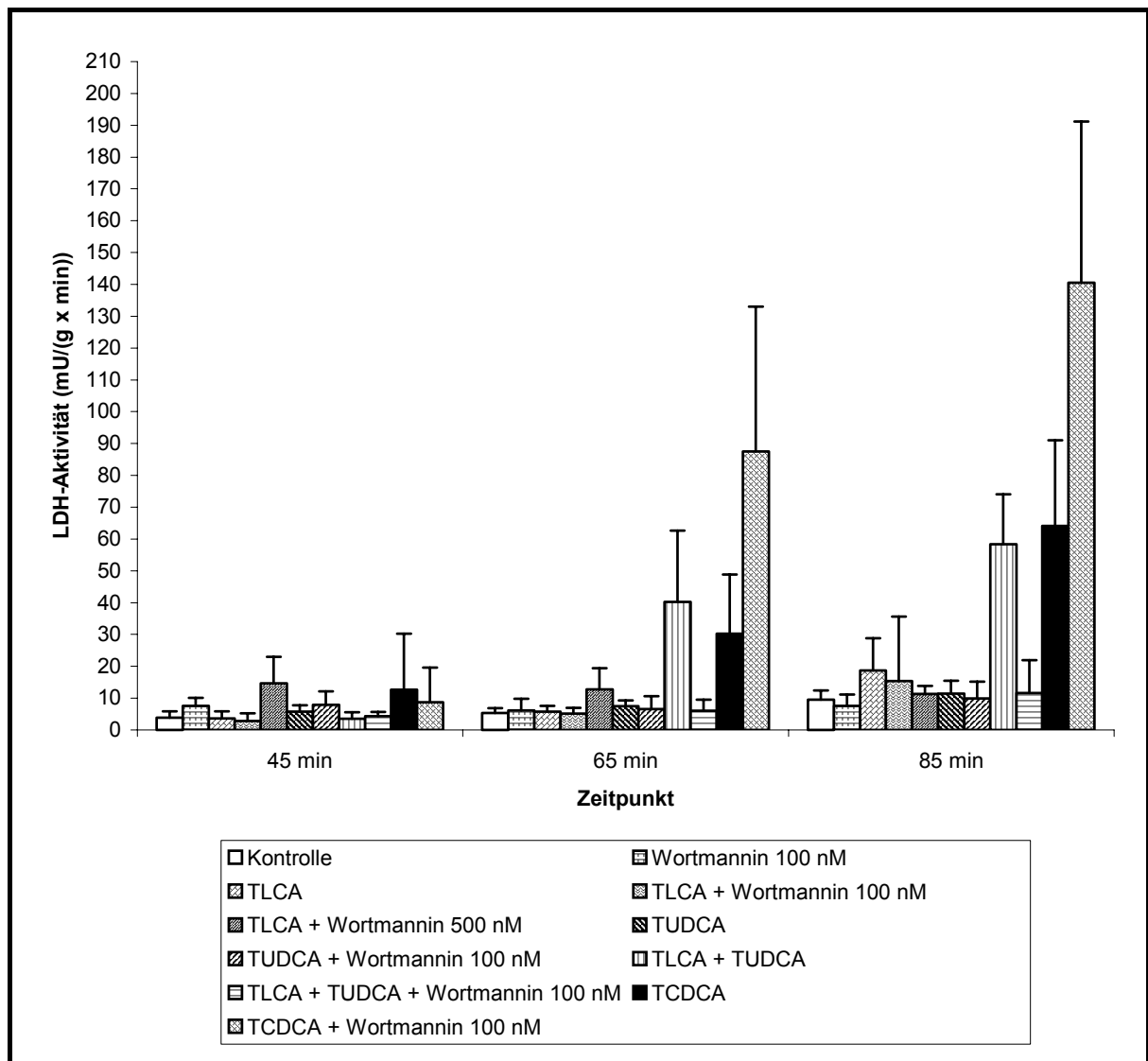


Abb. 21: LDH-Aktivität im Effluat (MW ± SD, n = 5 – 6).

3.1.4 Verteilung der PKC-Isoform ϵ

Die Verteilung der PKC-Isoform ϵ zwischen Membran- und Zytosolfraktion im Lebergewebe wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht.

Der membrangebundene Anteil der ϵ -PKC betrug unter Kontrollbedingungen (**Gruppe A**) $42,6 \pm 5,8$ %. Wortmannin (**Gruppe B**) beeinflusste die Membranbindung von ϵ -PKC unter Kontrollbedingungen nicht.

TLCA (**Gruppe C**) erhöhte die Membranbindung von ϵ -PKC signifikant gegenüber Kontrollen ($52,4 \pm 5,3$ % vs. $42,6 \pm 5,8$ %).

Der Effekt von TLCA wurde durch die Zugabe von TUDCA (**Gruppe H**) gegenüber Kontrollen aufgehoben. Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe I**) führte zu einer signifikanten Hemmung der Membranbindung von ϵ -PKC gegenüber der alleinigen Gabe von TLCA und TUDCA (siehe **Tabelle 15, Abb. 22** und **23**).

Tabelle 15: Membranbindung der PKC-Isoform ϵ (MW \pm SD, n = 5). * p < 0,05 (vs. Gruppe A), ** p = 0,01 (vs. Gruppe H).

Gruppe	Membranbindung (%)
A: Kontrolle.	$42,6 \pm 5,8$
B: Wortmannin 100 nM.	$44,7 \pm 4,5$
C: TLCA.	$52,4 \pm 5,3$ *
D: Wortmannin 100 nM + TLCA.	$46,1 \pm 7,6$
E: Wortmannin 500 nM + TLCA.	$51,2 \pm 4,1$
F: TUDCA.	$42,9 \pm 8,4$
G: Wortmannin 100 nM + TUDCA.	$45,3 \pm 3,0$
H: TLCA + TUDCA.	$46,2 \pm 4,5$
I: Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA.	$37,9 \pm 3,2$ **

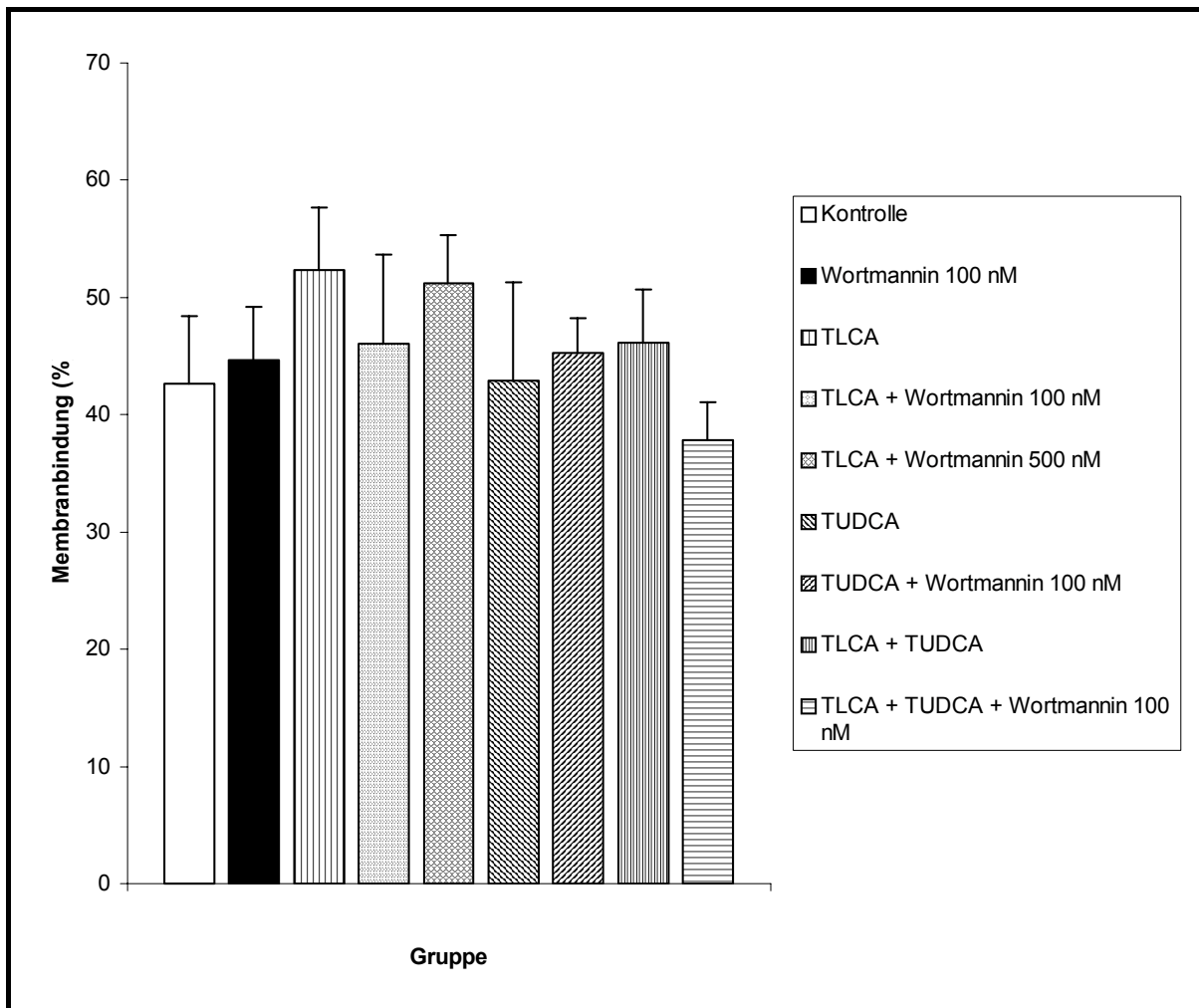


Abb. 22: Membranbindung der PKC-Isoform ϵ (MW \pm SD, n = 5).

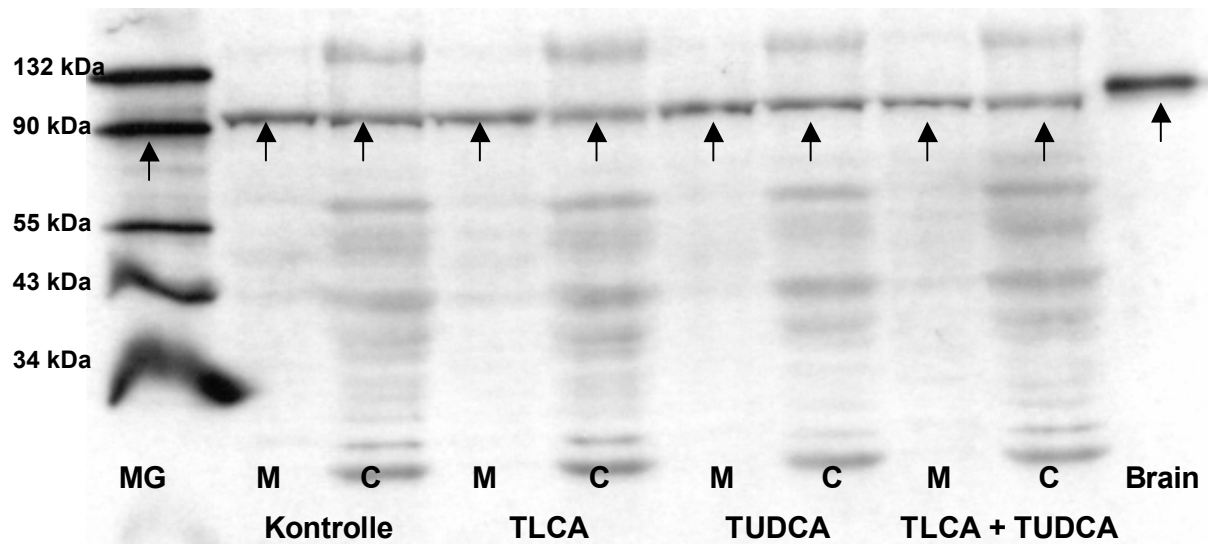


Abb. 23: Banden der PKC-Isoform ϵ im Western-Blot nach 45 sec Belichtungszeit. Legende: M: Membranfraktion. C: Zytosolfraction. MG: Molekulargewichtsmarker. Brain: PKC- ϵ -reiche Rattenhirnzytosolpräparation. Pfeile: Banden der PKC-Isoform ϵ bzw. der Referenzmarker.

3.2 Versuchsreihe II

Rattenlebern wurden in einer nichtrezirkulierenden Perfusion mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer für 75 min mit verschiedenen Gallensäuren perfundiert (siehe Perfusionsprotokoll II, **2.1.2**). Die PI₃-Kinasen der Leberzellen wurden durch Gabe des spezifischen PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin gehemmt. Zwischen der 40. und 50. min wurde zusätzlich CDNB zur Bestimmung der Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 appliziert.

3.2.1 Gallenfluß

3.2.1.1 Effekt von Wortmannin

Vor Infusion des CDNB lag der Gallenfluß bei unbehandelten Kontrollen (**Gruppe L**, 35. bis 40. min) bei $1,1 \pm 0,1 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$. In Folge der Applikation von CDNB (40. bis 50. min) kam es zu einem vorübergehenden Anstieg des Gallenflusses. Im anschließenden Verlauf fiel der Gallenfluß langsam auf zuletzt $0,8 \pm 0,1 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$ ab.

Der Gallenfluß zeigte unter Gabe des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (**Gruppe M**) keine signifikante Änderung gegenüber Kontrollen während der gesamten Versuchsdauer (siehe **Tabelle 16** und **Abb. 24**).

Tabelle 16: Gallenfluß bei Kontrollen ± Wortmannin (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	L (Kontrolle, n = 5)	M (Wortmannin 100 nM, n = 5)
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Gallenfluß (µl/(g x min))
20	1,26 ± 0,06	1,14 ± 0,07
25	1,22 ± 0,11	1,03 ± 0,07
30	1,16 ± 0,10	1,01 ± 0,11
35	1,11 ± 0,13	0,96 ± 0,10
40	1,05 ± 0,14	0,96 ± 0,13
45	1,01 ± 0,12	0,92 ± 0,15
50	1,27 ± 0,12	1,19 ± 0,20
55	1,49 ± 0,19	1,34 ± 0,23
60	1,45 ± 0,19	1,32 ± 0,25
65	1,23 ± 0,20	1,16 ± 0,22
70	1,06 ± 0,19	1,01 ± 0,19
75	0,93 ± 0,17	0,88 ± 0,16
80	0,87 ± 0,17	0,80 ± 0,14
85	0,80 ± 0,13	0,73 ± 0,13
90	0,78 ± 0,14	0,68 ± 0,13
95	0,75 ± 0,12	0,65 ± 0,14
Gallenfluß	53,17 ± 7,74 µl/(g x 50 min)	48,81 ± 8,71 µl/(g x 50 min)

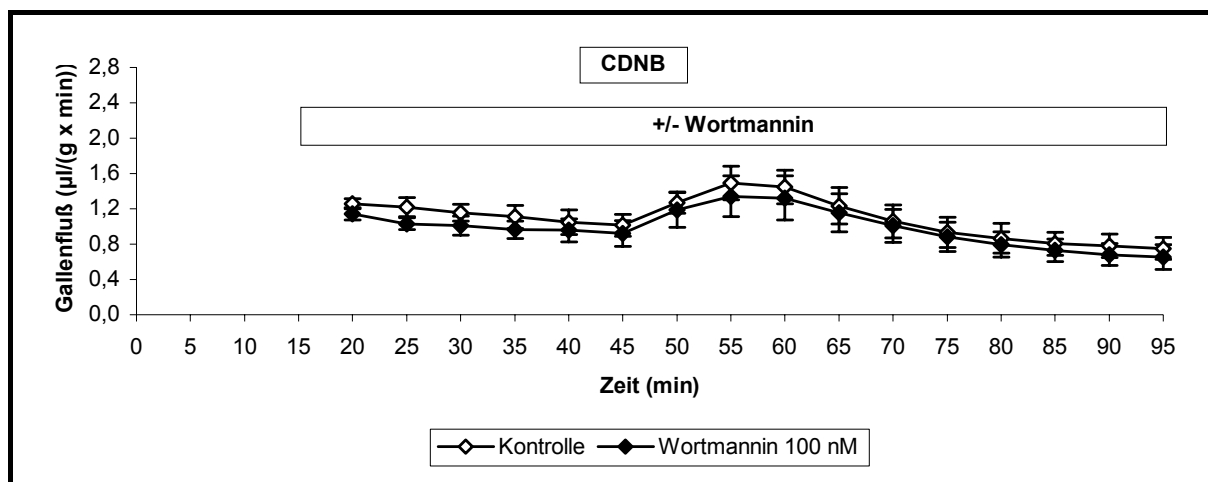


Abb. 24: Gallenfluß in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.2.1.2 Effekt von TLCA

Die Infusion von TLCA führte bei unbehandelten Lebern (**Gruppe N**) ähnlich wie beim Perfusionsprotokoll I (siehe 3.1.1.2) zum fast vollständigen Versiegen des Gallenflusses.

Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe O**) führte mit $17,3 \pm 6,3 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ vs. $3,4 \pm 1,6 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ zu einer signifikanten Steigerung des Gallenflusses (siehe **Tabelle 17** und **Abb. 25**).

Tabelle 17: Gallenfluß bei Gabe von TLCA ± Wortmannin (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min). * p < 0,01 (vs. Gruppe N).		
Gruppe	N (TLCA, n = 5)	O (Wortmannin 100 nM + TLCA, n = 5)
Zeit (min)	Gallenfluß ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)	Gallenfluß ($\mu\text{l}/(\text{g} \times \text{min})$)
20	$1,08 \pm 0,23$	$1,27 \pm 0,15$
25	$0,93 \pm 0,16$	$0,79 \pm 0,17$
30	$0,38 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,20$
35	$0,11 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,23$
40	$0,08 \pm 0,07$	$0,46 \pm 0,23$
45	$0,07 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,23$
50	$0,09 \pm 0,08$	$0,49 \pm 0,24$
55	$0,12 \pm 0,07$	$0,54 \pm 0,24$
60	$0,11 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,23$
65	$0,08 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,19$
70	$0,06 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,12$
75	$0,05 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,09$
80	$0,05 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,07$
85	$0,04 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,06$
90	$0,04 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,06$
95	$0,04 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,05$
Gallenfluß	$3,40 \pm 1,59 \mu\text{l}/(\text{g} \times 50 \text{ min})$	$17,26 \pm 6,32 \mu\text{l}/(\text{g} \times 50 \text{ min})^*$

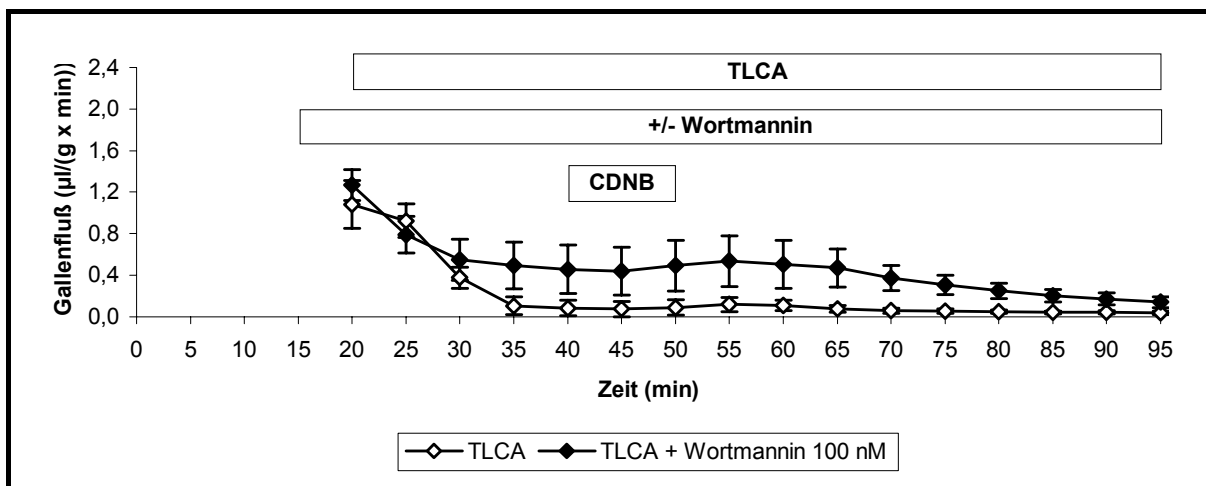


Abb. 25: Gallenfluß bei Gabe von TLCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.2.1.3 Effekt von TUDCA

Der Gallenfluß stieg bei Gabe von TUDCA (**Gruppe P**) um mehr als 75 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (**Gruppe L**, siehe 3.2.1.1) an.

Die Gabe von Wortmannin (**Gruppe Q**) führte zu keiner Veränderung des Gallenflusses (siehe **Tabelle 18** und **Abb. 26**).

Tabelle 18: Gallenfluß bei Gabe von TUDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Infusion von CDN (40. bis 50. min).		
Gruppe	P (TUDCA, n = 5)	Q (Wortmannin 100 nM + TUDCA, n = 5)
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Gallenfluß (µl/(g x min))
20	1,36 ± 0,25	1,26 ± 0,13
25	1,59 ± 0,44	1,48 ± 0,21
30	1,79 ± 0,41	1,69 ± 0,24
35	1,83 ± 0,36	1,69 ± 0,24
40	1,83 ± 0,33	1,72 ± 0,26
45	1,79 ± 0,32	1,72 ± 0,27
50	2,13 ± 0,32	2,04 ± 0,35
55	2,24 ± 0,32	2,13 ± 0,34
60	2,16 ± 0,29	2,06 ± 0,30
65	1,98 ± 0,27	1,92 ± 0,25
70	1,84 ± 0,25	1,80 ± 0,21
75	1,76 ± 0,25	1,74 ± 0,17
80	1,71 ± 0,23	1,65 ± 0,18
85	1,69 ± 0,23	1,60 ± 0,14
90	1,63 ± 0,23	1,57 ± 0,11
95	1,63 ± 0,24	1,53 ± 0,10
Gallenfluß	93,90 ± 13,10 µl/(g x 50 min)	90,22 ± 10,53 µl/(g x 50 min)

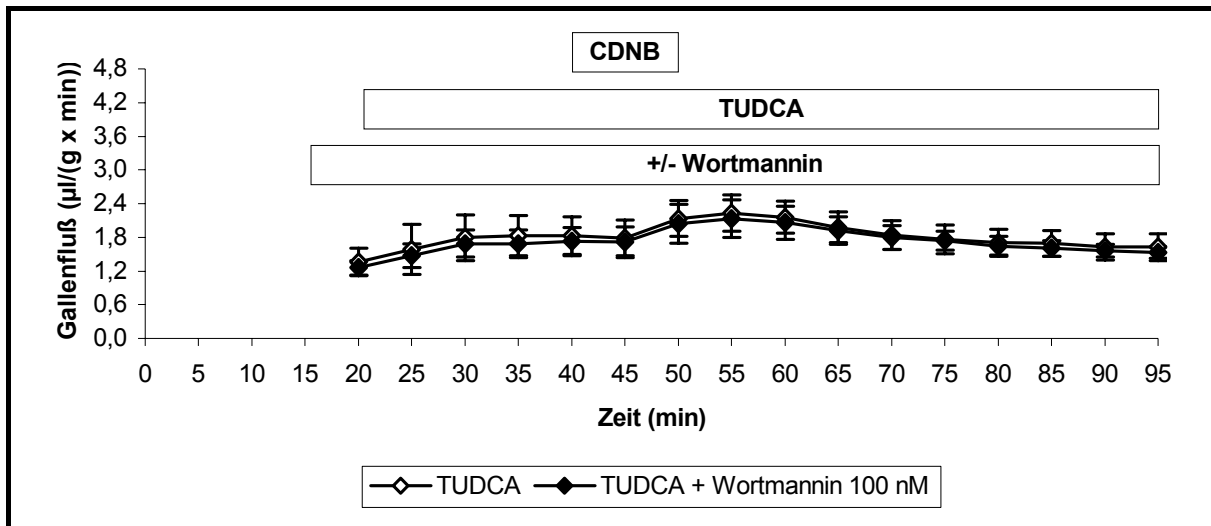


Abb. 26: Gallenfluß bei Gabe von TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW \pm SD, n = 5).

3.2.1.4 Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA

TUDCA konnte bei der gemeinsamen Gabe mit TLCA (**Gruppe R**) den cholestatischen Effekt dieser Gallensäure vollkommen aufheben.

Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (**Gruppe S**) führte mit $93,3 \pm 25,1 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ vs. $68,1 \pm 2,7 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ zu einem tendenziell erhöhten Gallenfluß ($p = 0,09$) (siehe **Tabelle 19** und **Abb. 27**).

Tabelle 19: Gallenfluß bei Gabe von TLCA und TUDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	R (TLCA + TUDCA, n = 5)	S (Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA, n = 5)
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Gallenfluß (µl/(g x min))
20	1,32 ± 0,11	1,32 ± 0,26
25	1,44 ± 0,10	1,40 ± 0,40
30	1,70 ± 0,17	1,69 ± 0,36
35	1,66 ± 0,21	1,82 ± 0,34
40	1,49 ± 0,20	1,84 ± 0,35
45	1,39 ± 0,18	1,84 ± 0,34
50	1,56 ± 0,19	2,14 ± 0,40
55	1,58 ± 0,08	2,21 ± 0,45
60	1,62 ± 0,06	2,16 ± 0,47
65	1,53 ± 0,06	2,08 ± 0,49
70	1,42 ± 0,03	1,98 ± 0,46
75	1,33 ± 0,04	1,83 ± 0,54
80	1,24 ± 0,10	1,73 ± 0,56
85	1,16 ± 0,13	1,63 ± 0,60
90	1,10 ± 0,13	1,52 ± 0,62
95	1,06 ± 0,13	1,39 ± 0,64
Gallenfluß	68,05 ± 2,70 µl/(g x 50 min)	93,30 ± 25,07µl/(g x 50 min)

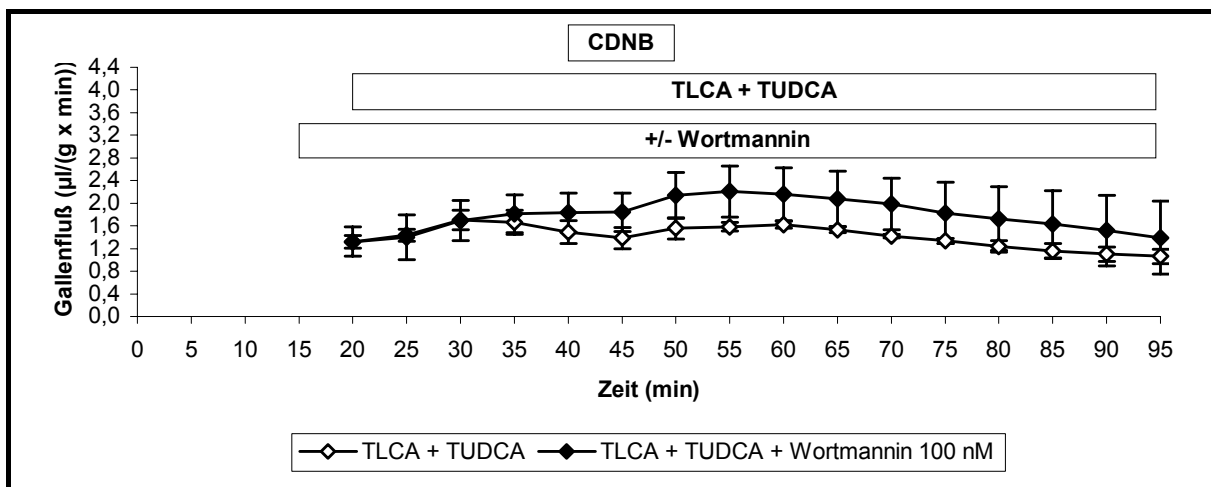


Abb. 27: Gallenfluß bei Gabe von TLCA und TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.2.1.5 Effekt von TCDCA

Die Gabe von TCDCA (**Gruppe T**) führte im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen (**Gruppe L**, siehe 3.2.1.1) zu einer deutlichen Verringerung des Gallenflusses.

Die Infusion von Wortmannin (**Gruppe U**) bewirkte keine weitere Veränderung des Gallenflusses (siehe **Tabelle 20** und **Abb. 28**).

Tabelle 20: Gallenfluß bei Gabe von TCDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	T (TCDCA, n = 5)	U (Wortmannin 100 nM + TCDCA, n = 5)
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Gallenfluß (µl/(g x min))
20	1,17 ± 0,30	1,20 ± 0,11
25	1,06 ± 0,36	1,01 ± 0,16
30	0,62 ± 0,32	0,55 ± 0,28
35	0,49 ± 0,29	0,52 ± 0,24
40	0,51 ± 0,30	0,51 ± 0,22
45	0,51 ± 0,31	0,45 ± 0,24
50	0,54 ± 0,38	0,41 ± 0,25
55	0,48 ± 0,39	0,36 ± 0,25
60	0,38 ± 0,34	0,29 ± 0,16
65	0,29 ± 0,26	0,24 ± 0,10
70	0,23 ± 0,19	0,24 ± 0,07
75	0,18 ± 0,14	0,19 ± 0,05
80	0,16 ± 0,12	0,17 ± 0,05
85	0,12 ± 0,09	0,16 ± 0,06
90	0,11 ± 0,07	0,15 ± 0,05
95	0,11 ± 0,06	0,15 ± 0,07
Gallenfluß	12,99 ± 9,91 µl/(g x 50 min)	11,77 ± 3,50 µl/(g x 50 min)

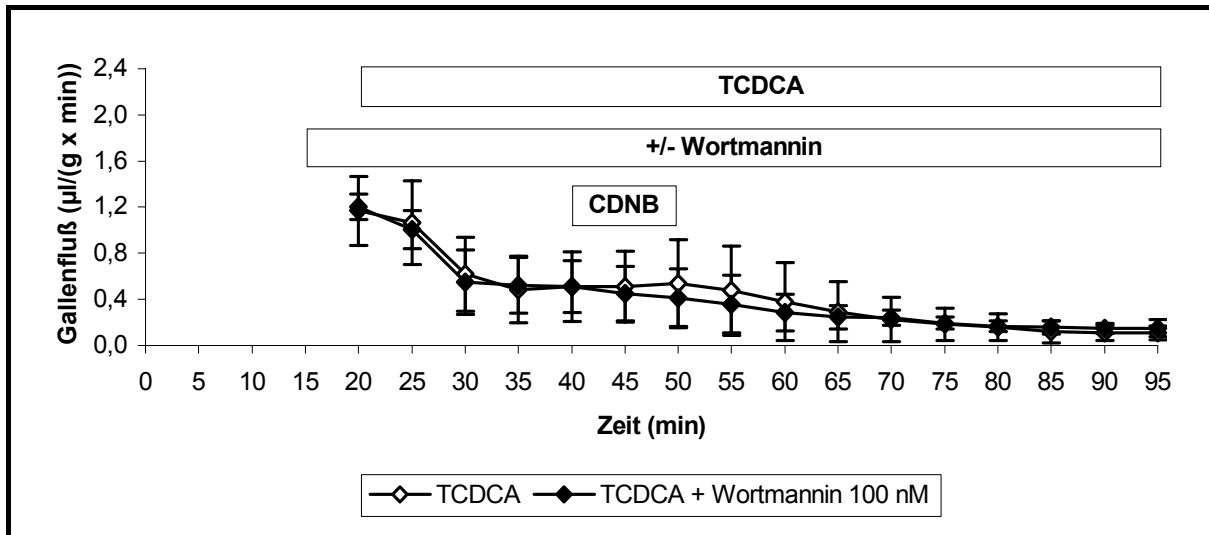


Abb. 28: Gallenfluß bei Gabe von TCDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.2.1.6 Modulation des Gallenflusses: Zusammenfassung

Die durch TLCA induzierte Hemmung des Gallenflusses wurde durch Wortmannin antagonisiert. Dagegen wurde die durch TUDCA induzierte Choleresese nach Hemmung der PI₃-Kinasen nicht beeinflusst. TUDCA und Wortmannin wirkten additiv den TLCA-Effekten auf den Gallenfluß entgegen (siehe **Abb. 29**).

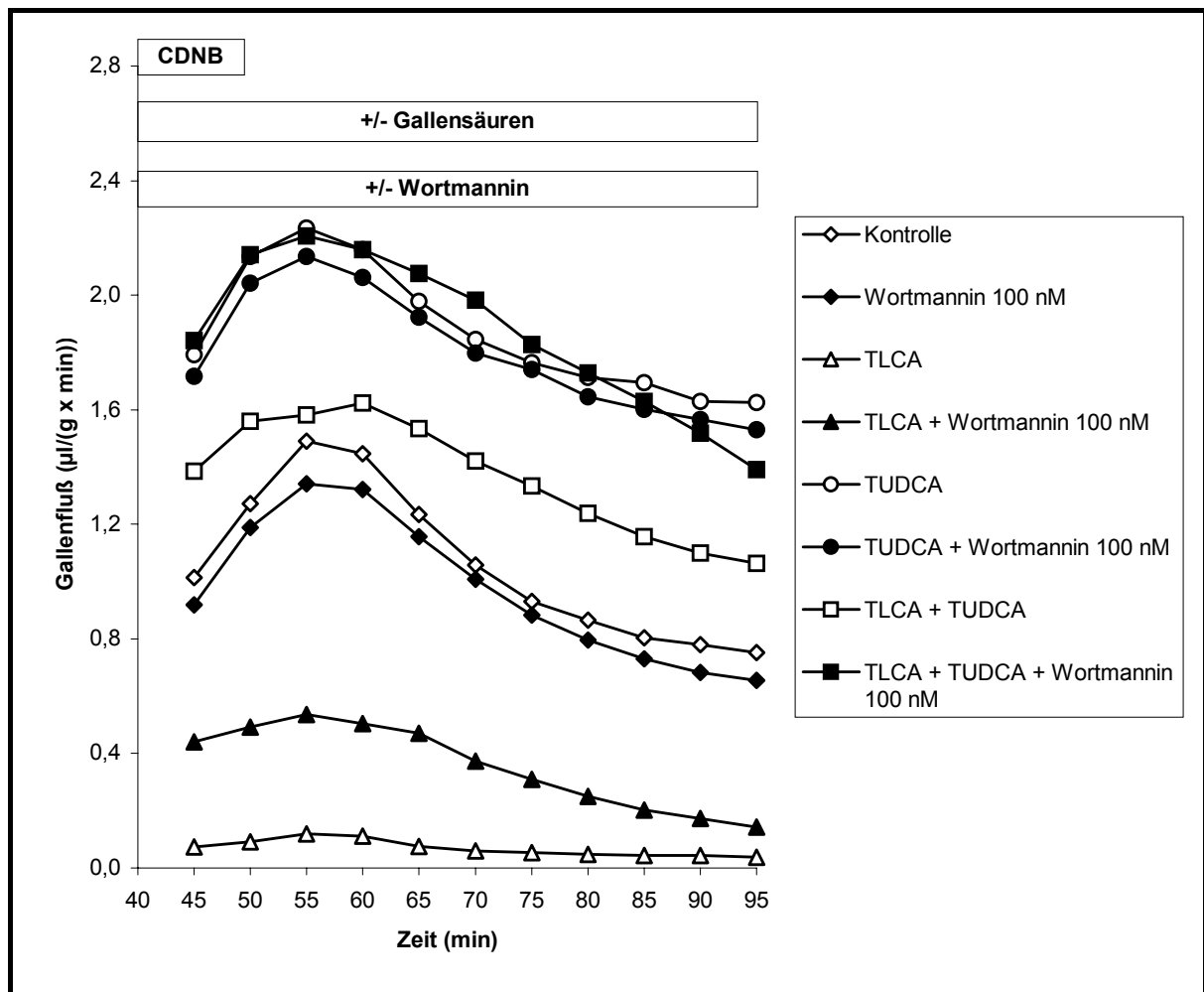


Abb. 29: Modulation des Gallenflusses (MW, n = 5).

3.2.2 Biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP

3.2.2.1 Effekt von Wortmannin

Die biliäre Sekretion von GS-DNP betrug nach Gabe von CDNB (30 μ M für 10 min) 730,0 \pm 119,8 nmol/(g Leber x 50 min) (**Gruppe L**). Die maximale Sekretionsrate von 31,9 \pm 5,0 nmol/(g Leber x min) wurde 20 min nach Beginn der Gabe von CDNB erreicht.

Der PI_3 -Kinase-Inhibitor Wortmannin (100 nM; **Gruppe M**) beeinflusste die biliäre Sekretion von GS-DNP unter Kontrollbedingungen nicht (siehe **Tabelle 21** und **Abb. 30**).

Tabelle 21: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Kontrollen \pm Wortmannin (MW \pm SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).		
Gruppe	L (Kontrolle, n = 5)	M (Wortmannin 100 nM, n = 5)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
45	0 \pm 0	0 \pm 0
50	12,30 \pm 3,89	12,58 \pm 3,86
55	29,57 \pm 6,63	27,68 \pm 7,86
60	31,87 \pm 5,00	31,75 \pm 5,93
65	22,71 \pm 4,01	22,75 \pm 3,77
70	15,38 \pm 2,59	15,11 \pm 3,53
75	11,13 \pm 2,09	9,90 \pm 1,77
80	8,29 \pm 1,35	6,96 \pm 1,84
85	6,02 \pm 0,90	5,11 \pm 1,02
90	4,87 \pm 0,62	3,60 \pm 1,16
95	3,85 \pm 0,38	2,85 \pm 0,52
GS-DNP-Sekretion	730,01 \pm 119,77 nmol/(g x 50 min)	691,50 \pm 139,13 nmol/(g x 50 min)

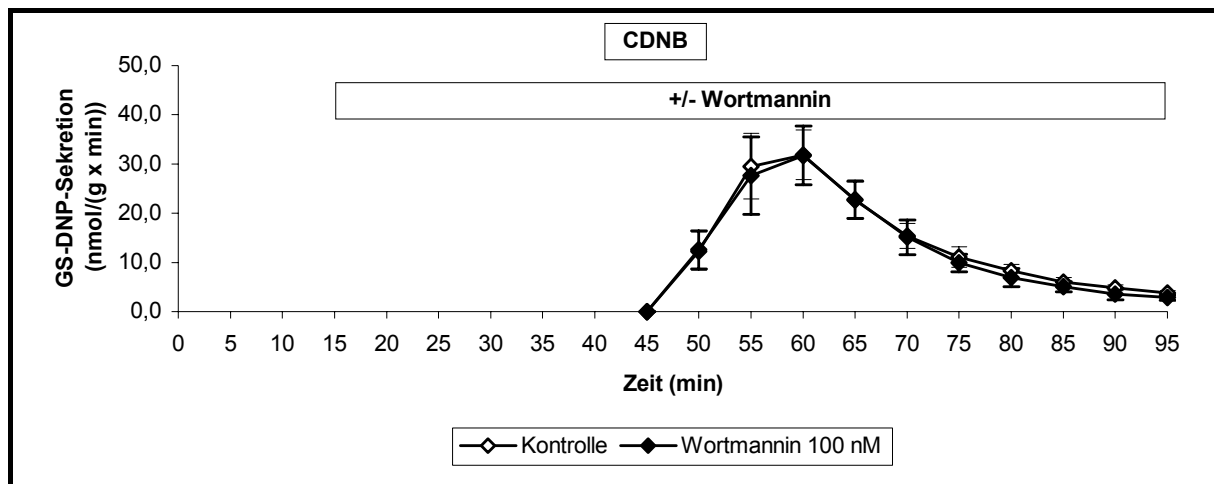


Abb. 30: Biliäre GS-DNP-Sekretion in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.2.2.2 Effekt von TLCA

Die Gabe der cholestatisch wirkenden Gallensäure TLCA (**Gruppe N**) führte nicht nur zu einer Reduktion des Gallenflusses (siehe 3.2.1.2), sondern auch zu einer deutlichen Beeinträchtigung der biliären GS-DNP-Sekretion um 95 % auf $38,6 \pm 25,0$ nmol/(g Leber x min).

Eine Hemmung der PI₃-Kinasen in der Leber durch Wortmannin während der Gabe von TLCA (**Gruppe O**) hatte eine signifikante Erhöhung der GS-DNP-Sekretion auf $110,5 \pm 60,5$ nmol/(g Leber x min) zur Folge (siehe **Tabelle 22** und **Abb. 31**).

Gruppe	N (TLCA, n = 5)	O (Wortmannin 100 nM + TLCA, n = 5)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
45	0 ± 0	0 ± 0
50	0,04 ± 0,09	0,74 ± 1,26
55	0,09 ± 0,11	3,53 ± 4,17
60	0,37 ± 0,45	5,47 ± 3,80
65	0,73 ± 0,81	5,05 ± 2,26
70	0,90 ± 0,77	3,16 ± 1,03
75	1,25 ± 1,00	1,77 ± 0,61
80	1,13 ± 0,87	0,94 ± 0,36
85	0,97 ± 0,63	0,66 ± 0,52
90	1,10 ± 0,59	0,38 ± 0,36
95	1,13 ± 0,83	0,39 ± 0,52
GS-DNP-Sekretion	38,64 ± 24,97 nmol/(g x 50 min)	110,49 ± 60,51 nmol/(g x 50 min) *

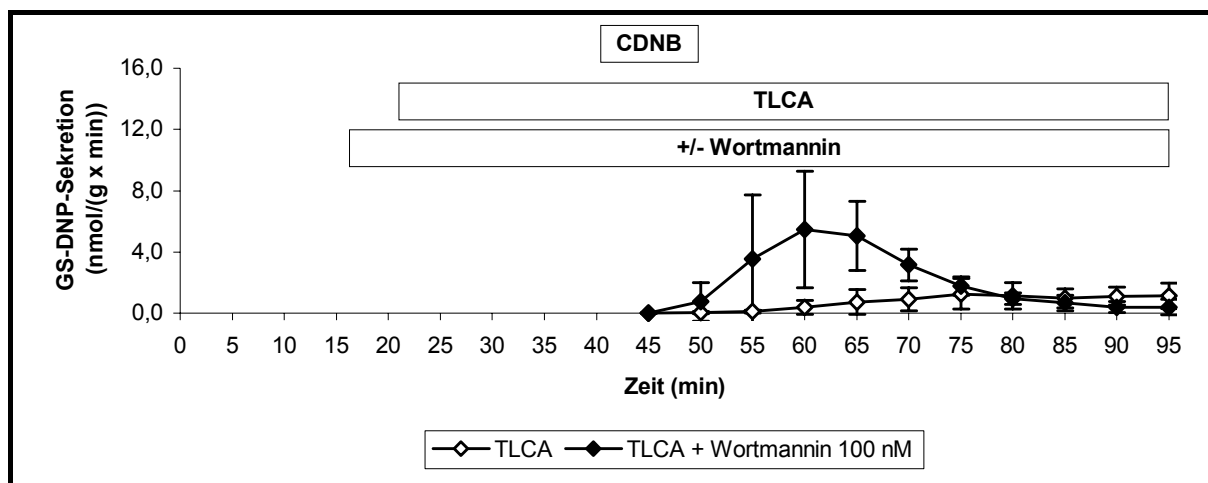


Abb. 31: Biliäre GS-DNP-Sekretion bei Gabe von TLCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI_3 -Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW \pm SD, n = 5).

3.2.2.3 Effekt von TUDCA

Die Gabe von TUDCA (**Gruppe P**) bewirkte eine Erhöhung der biliären GS-DNP-Sekretion um 27 % ($p < 0,05$) im Vergleich zu Kontrollen (**Gruppe L**, siehe 3.2.2.1).

Die durch TUDCA stimulierte GS-DNP-Sekretion wurde durch die Gabe von Wortmannin (**Gruppe Q**) nicht beeinflusst (siehe **Tabelle 23** und **Abb. 32**).

Tabelle 23: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von TUDCA \pm Wortmannin (MW \pm SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	P (TUDCA, n = 5)	Q (Wortmannin 100 nM + TUDCA, n = 5)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
45	0 \pm 0	0 \pm 0
50	24,95 \pm 3,20	23,16 \pm 4,59
55	43,90 \pm 5,46	41,15 \pm 7,83
60	39,58 \pm 3,91	35,00 \pm 8,13
65	22,91 \pm 5,77	22,77 \pm 5,37
70	16,04 \pm 2,43	15,28 \pm 3,53
75	12,46 \pm 1,92	11,80 \pm 2,64
80	8,87 \pm 1,43	8,43 \pm 1,79
85	6,89 \pm 1,13	6,34 \pm 1,35
90	5,09 \pm 0,75	4,63 \pm 1,15
95	4,09 \pm 0,67	3,69 \pm 0,74
GS-DNP-Sekretion	923,91 \pm 122,06 nmol/(g x 50 min)	861,19 \pm 176,56 nmol/(g x 50 min)

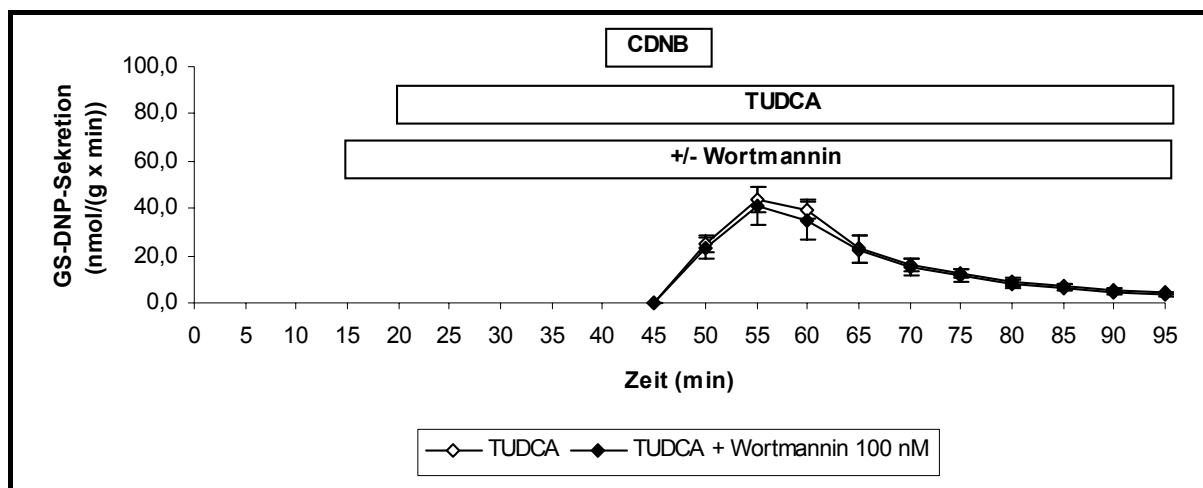


Abb. 32: Biliäre GS-DNP-Sekretion bei Gabe von TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI_3 -Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW \pm SD, n = 5).

3.2.2.4 Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA

Die zusätzliche Gabe von TUDCA (**Gruppe R**) führte zu einer weitgehenden Aufhebung des hemmenden Effekts von TLCA auf die GS-DNP-Sekretion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (**Gruppe L**, siehe 3.2.2.1).

Die Hemmung der PI_3 -Kinase durch Wortmannin (**Gruppe S**) führte mit $602,0 \pm 185,1$ nmol/(g Leber x 50 min) vs. $529,9 \pm 48,9$ nmol/(g Leber x 50 min) zu keiner signifikanten Erhöhung der GS-DNP-Sekretion (siehe **Tabelle 24** und **Abb. 33**).

Tabelle 24: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von TLCA und TUDCA \pm Wortmannin (MW \pm SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	R (TLCA + TUDCA, n = 5)	S (Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA, n = 5)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
45	0 \pm 0	0 \pm 0
50	11,49 \pm 1,94	12,13 \pm 3,04
55	21,90 \pm 1,88	25,66 \pm 9,11
60	24,28 \pm 2,04	29,24 \pm 8,27
65	17,17 \pm 2,28	22,35 \pm 8,26
70	11,34 \pm 2,15	14,65 \pm 6,18
75	7,44 \pm 1,52	7,20 \pm 3,06
80	4,94 \pm 0,88	4,34 \pm 1,92
85	3,33 \pm 0,60	2,77 \pm 1,52
90	2,39 \pm 0,44	1,43 \pm 1,01
95	1,69 \pm 0,36	0,63 \pm 0,77
GS-DNP-Sekretion	529,88 \pm 48,88 nmol/(g x 50 min)	602,04 \pm 185,13 nmol/(g x 50 min)

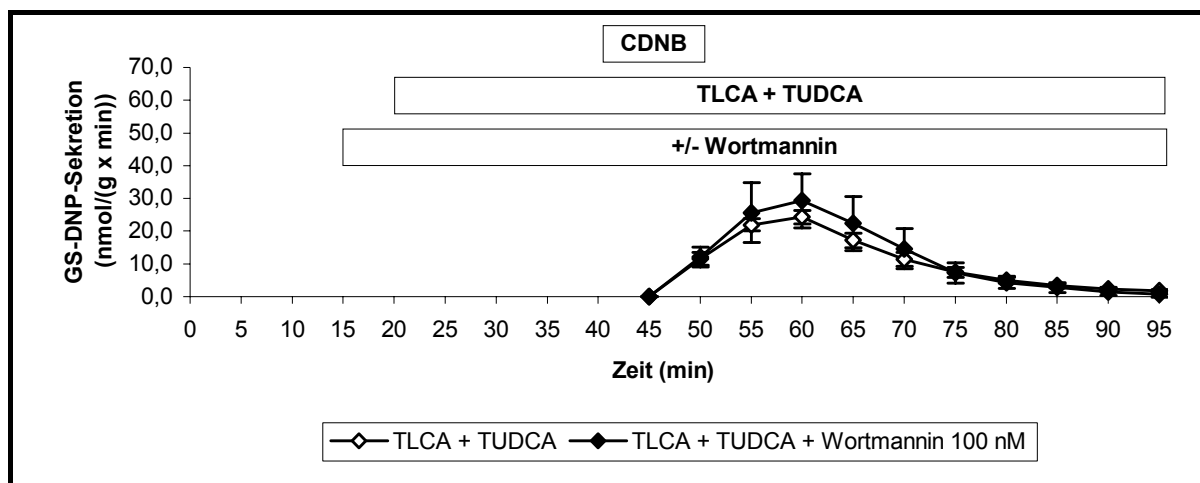


Abb. 33: Biliäre GS-DNP-Sekretion bei Gabe von TLCA und TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.2.2.5 Effekt von TCDCA

TCDCA (**Gruppe T**) führte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (**Gruppe L**, siehe 3.2.2.1) zu einer deutlichen Verringerung der GS-DNP-Sekretion. Die Abnahme war jedoch nicht so ausgeprägt wie bei TLCA (**Gruppe N**, siehe 3.2.2.2).

Wortmannin hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Transportkapazität des apikalen Transporters Mrp2 (siehe **Tabelle 25** und **Abb. 34**).

Tabelle 25: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von TCDCA ± Wortmannin (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	T (TCDCA, n = 5)	U (Wortmannin 100 nM + TCDCA, n = 5)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
45	0 ± 0	0 ± 0
50	2,42 ± 2,44	1,88 ± 1,71
55	5,79 ± 4,17	4,70 ± 4,11
60	5,45 ± 3,58	3,23 ± 2,53
65	4,00 ± 1,46	2,33 ± 1,89
70	2,76 ± 0,67	2,10 ± 0,55
75	2,64 ± 1,59	1,11 ± 0,30
80	2,00 ± 1,14	0,63 ± 0,18
85	1,13 ± 0,56	0,42 ± 0,10
90	0,92 ± 0,55	0,29 ± 0,05
95	0,93 ± 1,15	0,23 ± 0,07
GS-DNP-Sekretion	140,25 ± 54,49 nmol/(g x 50 min)	84,64 ± 53,38 nmol/(g x 50 min)

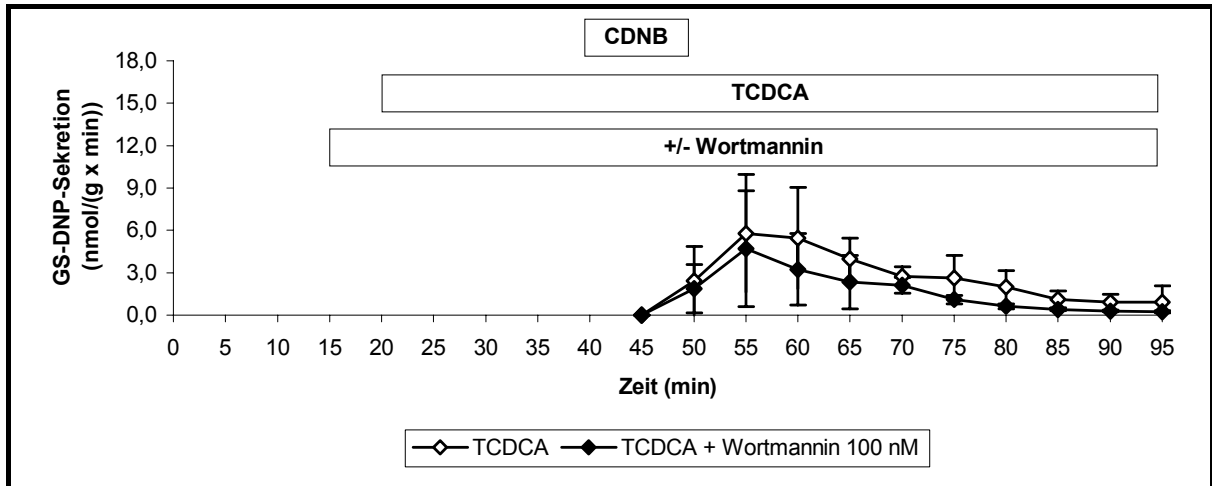


Abb. 34: Biliäre GS-DNP-Sekretion bei Gabe von TCDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin (MW ± SD, n = 5).

3.2.2.6 Modulation der biliären GS-DNP-Sekretion: Zusammenfassung

Die durch TLCA induzierte Hemmung der hepatobiliären GS-DNP-Sekretion wurde durch Wortmannin antagonisiert. Dagegen wurde die durch TUDCA induzierte Steigerung nach Hemmung der PI₃-Kinasen nicht beeinflusst. TUDCA und Wortmannin wirkten additiv den TLCA-Effekten auf die biliäre GS-DNP-Sekretion entgegen (siehe **Abb. 35**).

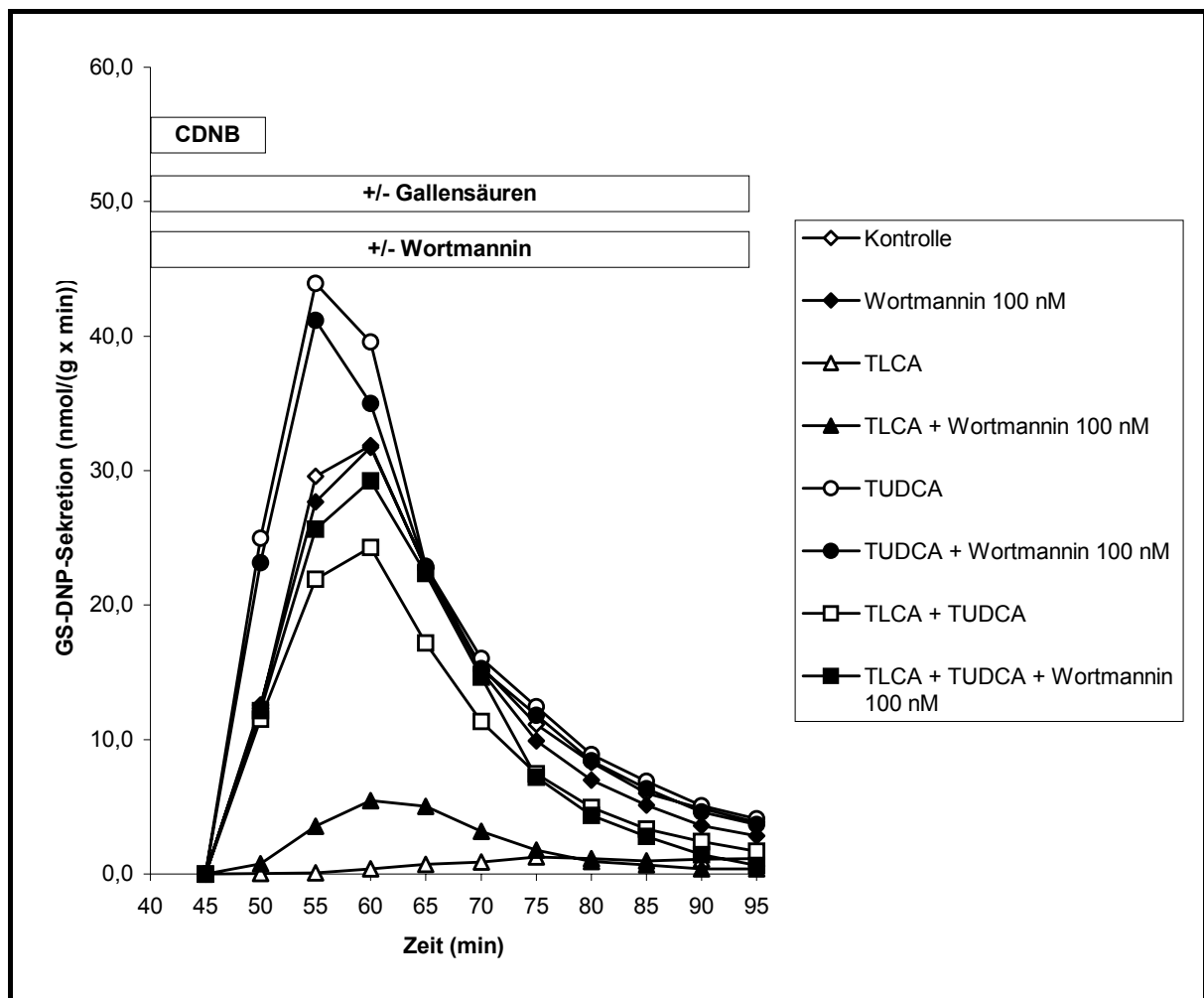


Abb. 35: Modulation der biliären GS-DNP-Sekretion (MW, n = 5).

3.2.3 Aktivität der LDH

Die LDH-Abgabe in das Effluat als Maß der Leberzellschädigung im experimentellen Modell der isoliert perfundierten Rattenleber war unter Kontrollbedingungen (**Gruppe L**) stabil niedrig und wurde auch durch Wortmannin (**Gruppe M**) und TUDCA (**Gruppe P**) nicht beeinflusst.

TLCA (**Gruppe N**) induzierte einen Anstieg der LDH-Abgabe nach 65 und 85 min, der bei gleichzeitiger Gabe von Wortmannin (**Gruppe O**) nicht beobachtet wurde. TUDCA verstärkte die durch TLCA ausgelöste LDH-Abgabe (**Gruppe R**). Auch der durch TLCA und TUDCA ausgelöste Leberzellschaden wurde durch Wortmannin signifikant vermindert (**Gruppe S**).

Die durch TCDCA ausgelöste Leberzellschädigung (**Gruppe T**) war durch gleichzeitige Gabe von Wortmannin (**Gruppe U**) nicht hemmbar. Im Gegenteil, Wortmannin stimulierte die durch TCDCA induzierte LDH-Sekretion (siehe **Tabelle 26** und **Abb. 36**).

Gruppe	LDH-Aktivität (mU/(g x min))		
	45 min	65 min	85 min
L: Kontrolle.	3,7 ± 1,4	6,0 ± 8,9	4,0 ± 0,9
M: Wortmannin 100 nM.	3,6 ± 2,0	2,8 ± 1,5	5,5 ± 4,1
N: TLCA.	3,8 ± 0,8	9,4 ± 1,0	30,0 ± 8,0
O: Wortmannin 100 nM + TLCA.	3,1 ± 0,8	4,4 ± 1,5 p < 0,01 (vs. Gruppe N)	4,8 ± 1,1 p < 0,01 (vs. Gruppe N)
P: TUDCA.	1,9 ± 1,3	2,2 ± 0,9	6,4 ± 8,2
Q: Wortmannin 100 nM + TUDCA.	3,3 ± 1,7	4,6 ± 2,6	7,9 ± 6,8
R: TLCA + TUDCA.	59,5 ± 21,2	44,2 ± 3,8	55,9 ± 7,5
S: Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA.	4,9 ± 1,2 p < 0,01 (vs. Gruppe R)	6,9 ± 3,6 p < 0,01 (vs. Gruppe R)	10,4 ± 5,8 p < 0,01 (vs. Gruppe R)
T: TCDCA.	56,4 ± 19,9	76,1 ± 14,1	128,3 ± 27,9
U: Wortmannin 100 nM + TCDCA.	104,5 ± 26,3 p = 0,01 (vs. Gruppe T)	106,6 ± 45,6	162,3 ± 51,7

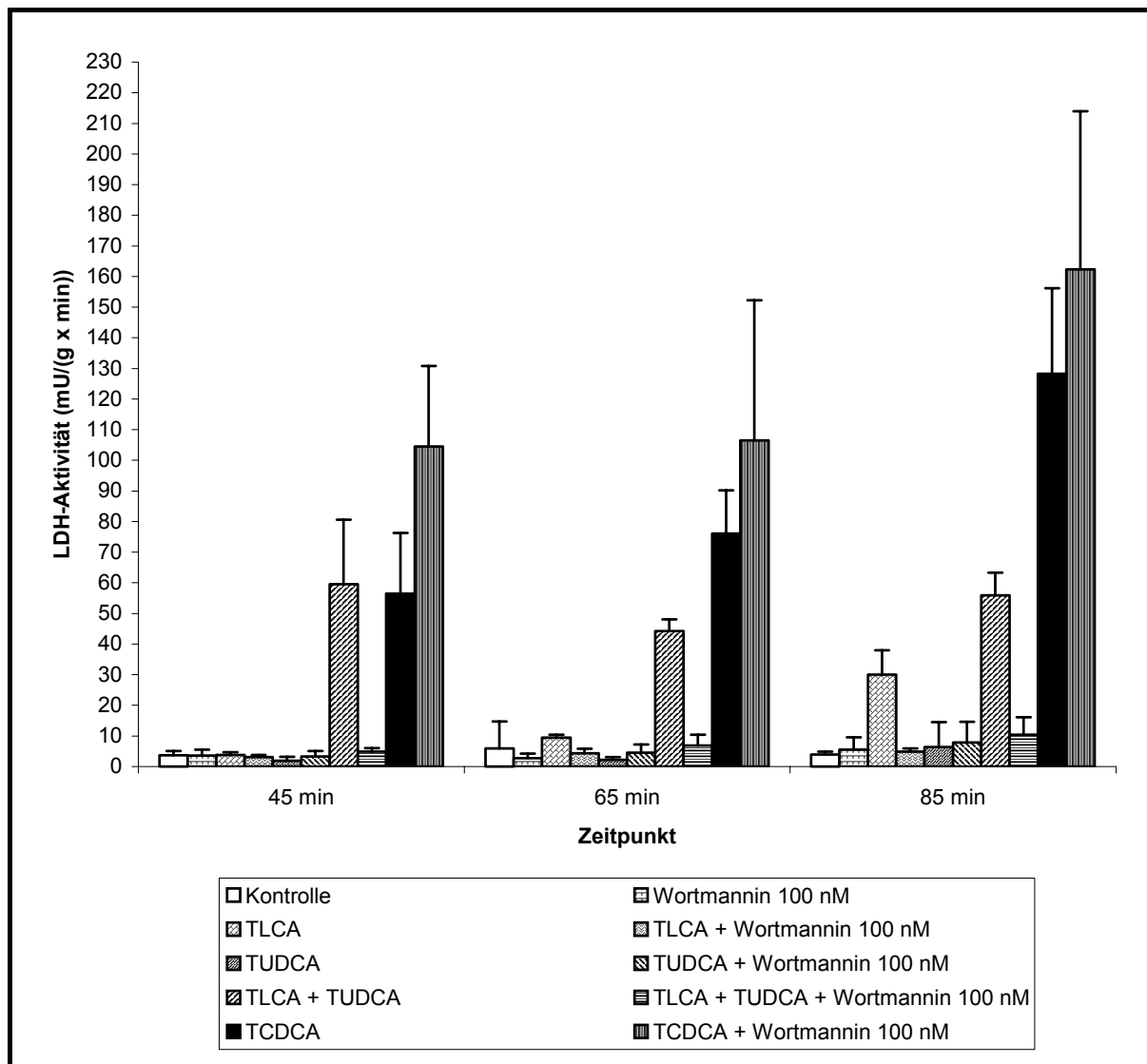


Abb. 36: LDH-Aktivität im Effluat (MW \pm SD, n = 5).

3.3 Versuchsreihe III

In Versuchsreihe III wurde die Bedeutung der PKC-Isoform α für die durch TUDCA gesteigerte hepatobiliäre Sekretion am Modell der cholestatischen Rattenleber untersucht.

Rattenlebern wurden in einer nichtrezirkulierenden Perfusion mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer für 75 min mit Gallensäuren perfundiert (siehe Perfusionsprotokoll III, 2.1.3). Die α -PKC der Leberzellen wurde durch Gabe des spezifischen Inhibitors BIM-I gehemmt. Zwischen der 40. und 50. min wurde zusätzlich CDNB zur Messung der Transportkapazität der apikalen Konjugatexportpumpe Mrp2 appliziert.

3.3.1 Gallenfluß

3.3.1.1 Effekt von BIM-I

Der Gallenfluß betrug bei unbehandelten Kontrollen (**Gruppe L**) zu Beginn der Perfusion (15. bis 20. min) $1,3 \pm 0,1 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times \text{min})$. In Folge der Applikation von CDNB (40. bis 50. min) kam es zu einem vorübergehenden Anstieg des Gallenflusses. Dieser lag zwischen der 45. und 95. min bei $53,2 \pm 7,7 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$.

Der Gallenfluß zeigte unter Gabe des PKC-Inhibitors BIM-I (**Gruppe V**) keine Änderung gegenüber Kontrollen während der gesamten Versuchsdauer (siehe **Tabelle 27** und **Abb. 37**).

Tabelle 27: Gallenfluß bei Kontrollen \pm BIM-I (MW \pm SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	L (Kontrolle, n = 5)	V (BIM-I 1 μ M, n = 3)
Zeit (min)	Gallenfluß (μ l/(g x min))	Gallenfluß (μ l/(g x min))
20	1,26 \pm 0,06	1,29 \pm 0,13
25	1,22 \pm 0,11	1,18 \pm 0,11
30	1,16 \pm 0,10	1,16 \pm 0,15
35	1,11 \pm 0,13	1,13 \pm 0,13
40	1,05 \pm 0,14	1,10 \pm 0,10
45	1,01 \pm 0,12	1,06 \pm 0,10
50	1,27 \pm 0,12	1,33 \pm 0,18
55	1,49 \pm 0,19	1,50 \pm 0,21
60	1,45 \pm 0,19	1,52 \pm 0,20
65	1,23 \pm 0,20	1,37 \pm 0,15
70	1,06 \pm 0,19	1,23 \pm 0,12
75	0,93 \pm 0,17	1,10 \pm 0,10
80	0,87 \pm 0,17	0,96 \pm 0,04
85	0,80 \pm 0,13	0,88 \pm 0,11
90	0,78 \pm 0,14	0,84 \pm 0,12
95	0,75 \pm 0,12	0,81 \pm 0,14
Gallenfluß	53,17 \pm 7,74 μ l/(g x 50 min)	57,74 \pm 3,95 μ l/(g x 50 min)

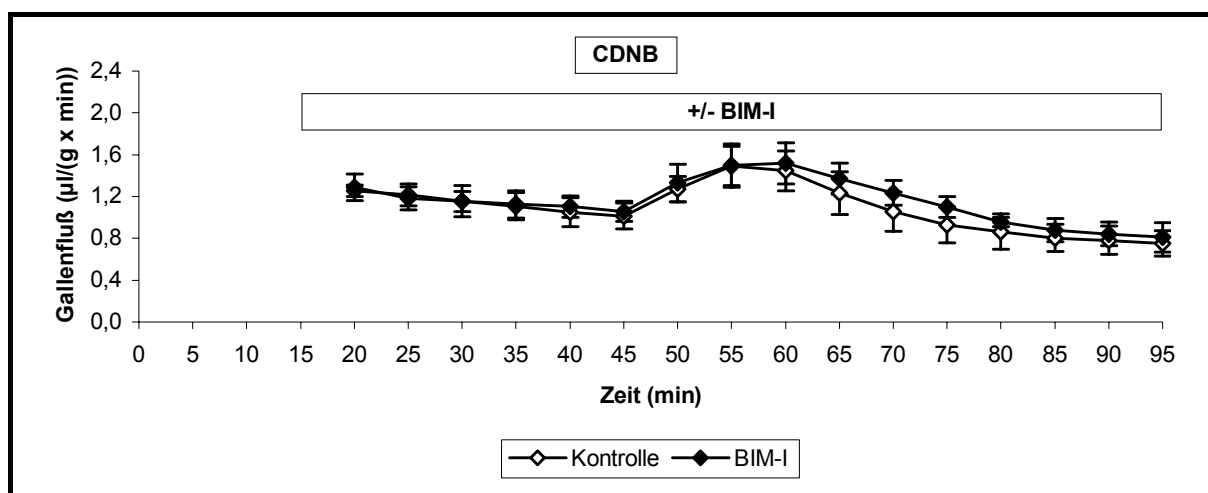


Abb. 37: Gallenfluß in Gegenwart und Abwesenheit des PKC-Inhibitors BIM-I (MW \pm SD, n = 3 – 5).

3.3.1.2 Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA

Bei den TLCA/TUDCA-Versuchen betrug der Gallenfluß in Abwesenheit des PKC-Inhibitors BIM-I (**Gruppe R**) 68,1 \pm 2,7 μ l/(g Leber x 50 min).

Die Infusion von BIM-I (**Gruppe W**) führte zu einer deutlichen, jedoch nicht signifikanten Verringerung des Gallenflusses auf $38,4 \pm 18,4 \mu\text{l}/(\text{g Leber} \times 50 \text{ min})$ ($p = 0,11$) (siehe **Tabelle 28** und **Abb. 38**).

Tabelle 28: Gallenfluß bei Gabe von TLCA und TUDCA ± BIM-I (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).		
Gruppe	R (TLCA + TUDCA, n = 5)	W (BIM-I 1 µM + TLCA + TUDCA, n = 3)
Zeit (min)	Gallenfluß (µl/(g x min))	Gallenfluß (µl/(g x min))
20	1,32 ± 0,11	1,04 ± 0,20
25	1,44 ± 0,10	0,98 ± 0,36
30	1,70 ± 0,17	0,93 ± 0,48
35	1,66 ± 0,21	1,07 ± 0,44
40	1,49 ± 0,20	0,97 ± 0,40
45	1,39 ± 0,18	0,85 ± 0,36
50	1,56 ± 0,19	0,93 ± 0,40
55	1,58 ± 0,08	0,98 ± 0,41
60	1,62 ± 0,06	0,94 ± 0,44
65	1,53 ± 0,06	0,90 ± 0,45
70	1,42 ± 0,03	0,81 ± 0,40
75	1,33 ± 0,04	0,74 ± 0,36
80	1,24 ± 0,10	0,67 ± 0,34
85	1,16 ± 0,13	0,61 ± 0,32
90	1,10 ± 0,13	0,57 ± 0,29
95	1,06 ± 0,13	0,52 ± 0,28
Gallenfluß	68,05 ± 2,70 µl/(g x 50 min)	38,37 ± 18,39 µl/(g x 50 min)

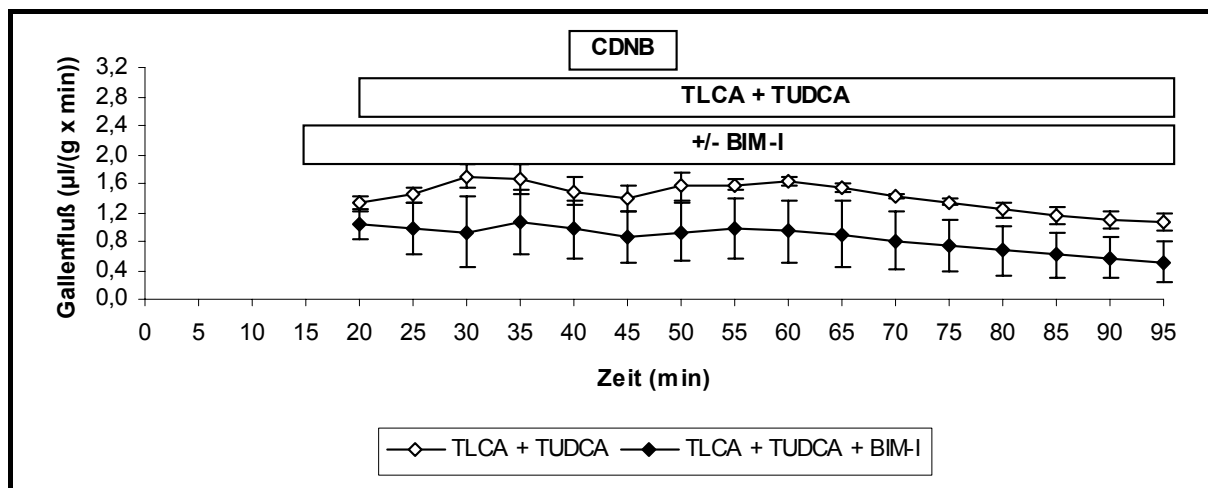


Abb. 38: Gallenfluß bei Gabe von TLCA und TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PKC-Inhibitors BIM-I (MW ± SD, n = 3 – 5).

3.3.1.3 Modulation des Gallenflusses: Zusammenfassung

Bei gegenüber TLCA und TUDCA exponierten Lebern führte die Hemmung der PKC-Isoform α zu einer deutlichen, jedoch nicht signifikanten, Verringerung des Gallenflusses (siehe **Abb. 39**).

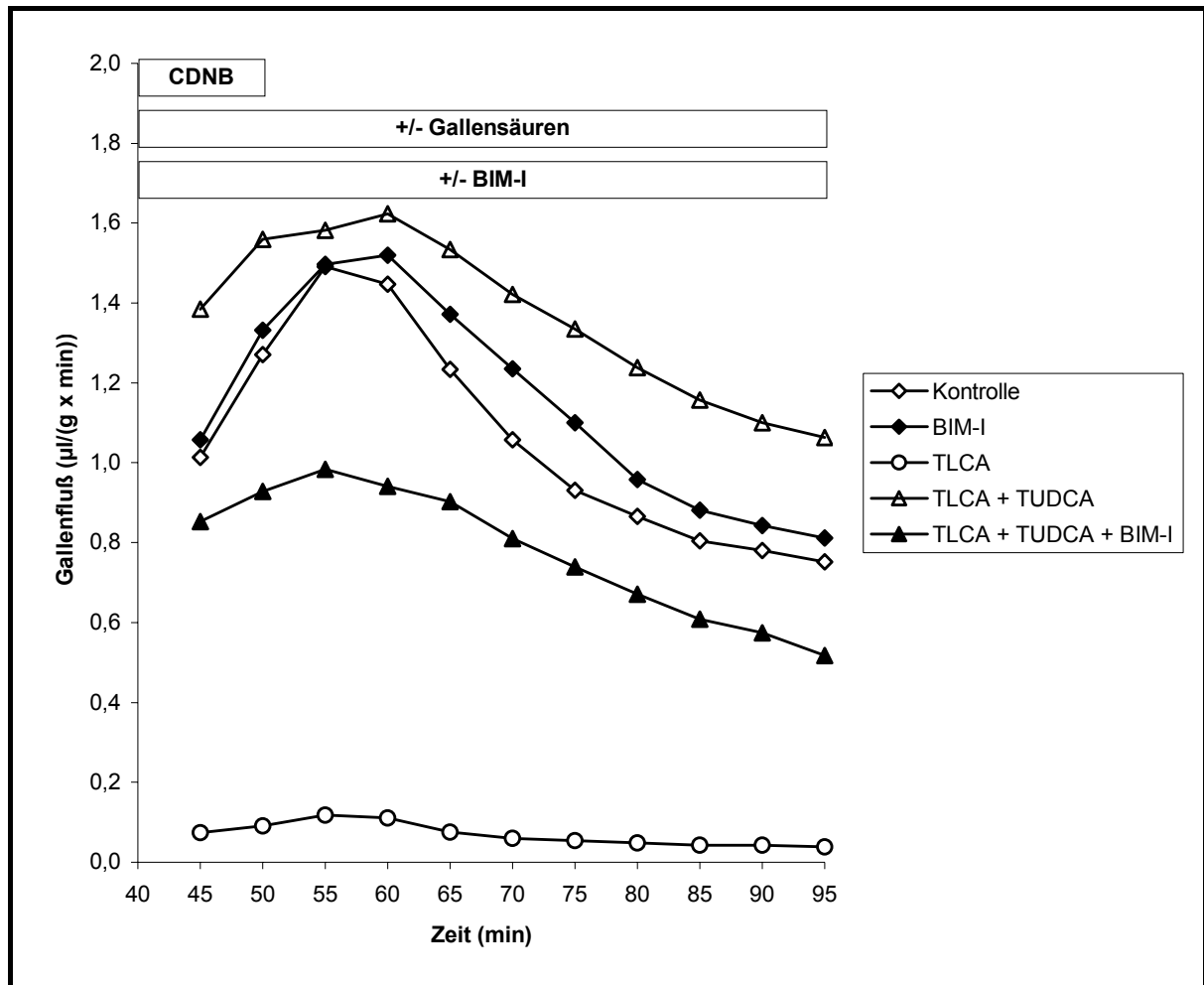


Abb. 39: Modulation des Gallenflusses (MW, n = 3 – 5).

3.3.2 Biliäre Sekretion des Mrp2-Substrats GS-DNP

3.3.2.1 Effekt von BIM-I

Eine Hemmung der PKC durch BIM-I (**Gruppe V**) führte zu keiner signifikanten Veränderung der biliären Sekretion von GS-DNP gegenüber unbehandelten Kontrollen während der gesamten Versuchsdauer (siehe **Tabelle 29** und **Abb. 40**).

Tabelle 29: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Kontrollen ± BIM-I (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min).

Gruppe	L (Kontrolle, n = 5)	V (BIM-I 1 µM, n = 3)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
45	0 ± 0	0 ± 0
50	12,30 ± 3,89	11,25 ± 3,85
55	29,57 ± 6,63	25,92 ± 8,21
60	31,87 ± 5,00	29,07 ± 8,91
65	22,71 ± 4,01	20,88 ± 5,39
70	15,38 ± 2,59	14,99 ± 2,43
75	11,13 ± 2,09	10,89 ± 0,83
80	8,29 ± 1,35	8,37 ± 1,28
85	6,02 ± 0,90	6,95 ± 1,61
90	4,87 ± 0,62	5,48 ± 1,62
95	3,85 ± 0,38	4,45 ± 1,76
GS-DNP-Sekretion	730,01 ± 119,77 nmol/(g x 50 min)	691,28 ± 125,74 nmol/(g x 50 min)

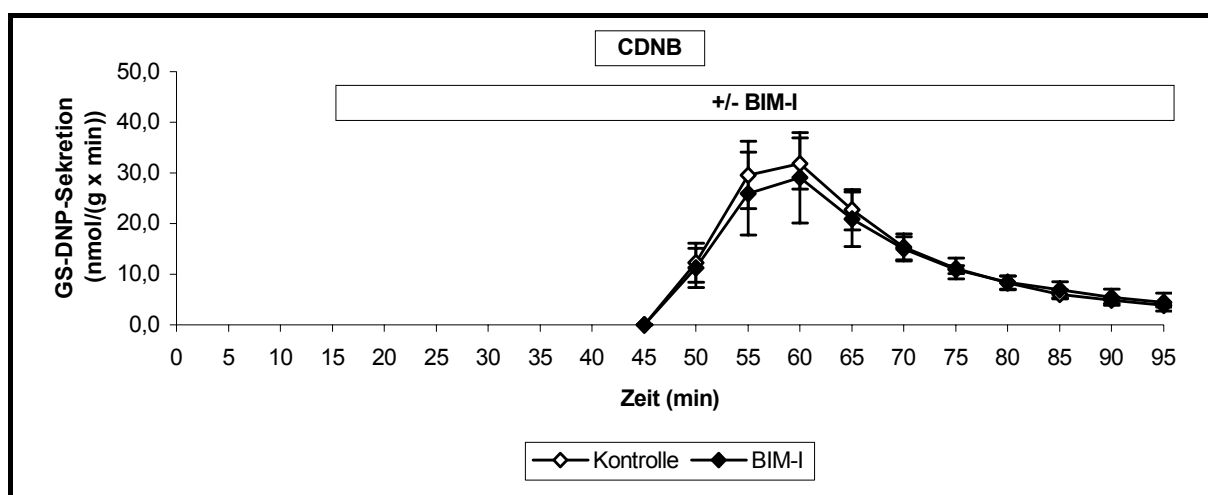


Abb. 40: Biliäre GS-DNP-Sekretion in Gegenwart und Abwesenheit des PKC-Inhibitors BIM-I (MW ± SD, n = 3 – 5).

3.3.2.2 Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA

Die Zugabe des PKC-Inhibitors BIM-I (**Gruppe W**) führte mit $268,9 \pm 100,6$ nmol/(g Leber x 50 min) vs. $529,9 \pm 48,9$ nmol/(g Leber x 50 min) zu einer signifikanten Verringerung der GS-DNP-Sekretion um 49 % (siehe **Tabelle 30** und **Abb. 41**).

Tabelle 30: Biliäre Sekretion von GS-DNP bei Gabe von TLCA und TUDCA ± BIM-I (MW ± SD). Infusion von CDNB (40. bis 50. min). * p < 0,05 (vs. Gruppe R).		
Gruppe	R (TLCA + TUDCA, n = 5)	W (BIM-I 1 µM + TLCA + TUDCA, n = 3)
Zeit (min)	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))	GS-DNP-Sekretion (nmol/(g x min))
45	0 ± 0	0 ± 0
50	11,49 ± 1,94	4,30 ± 1,91
55	21,90 ± 1,88	10,77 ± 3,64
60	24,28 ± 2,04	12,46 ± 4,40
65	17,17 ± 2,28	9,35 ± 3,66
70	11,34 ± 2,15	5,86 ± 2,22
75	7,44 ± 1,52	4,00 ± 1,56
80	4,94 ± 0,88	2,80 ± 1,15
85	3,33 ± 0,60	1,89 ± 0,81
90	2,39 ± 0,44	1,43 ± 0,60
95	1,69 ± 0,36	0,91 ± 0,39
GS-DNP-Sekretion	529,88 ± 48,88 nmol/(g x 50 min)	268,87 ± 100,63 nmol/(g x 50 min) *

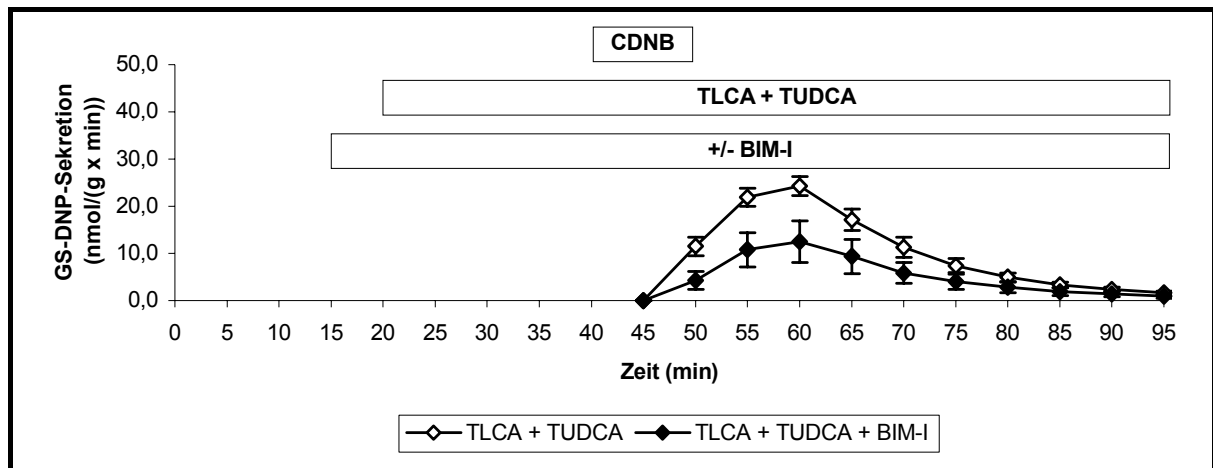


Abb. 41: Biliäre GS-DNP-Sekretion bei Gabe von TLCA und TUDCA in Gegenwart und Abwesenheit des PKC-Inhibitors BIM-I (MW ± SD, n = 3 – 5).

3.3.2.3 Modulation der biliären GS-DNP-Sekretion: Zusammenfassung

Die durch TUDCA erhöhte biliäre Sekretion des organischen Modellanions GS-DNP wurde bei durch TLCA induzierter Cholestase durch die Hemmung der PKC-Isoform α verringert (siehe **Abb. 42**).

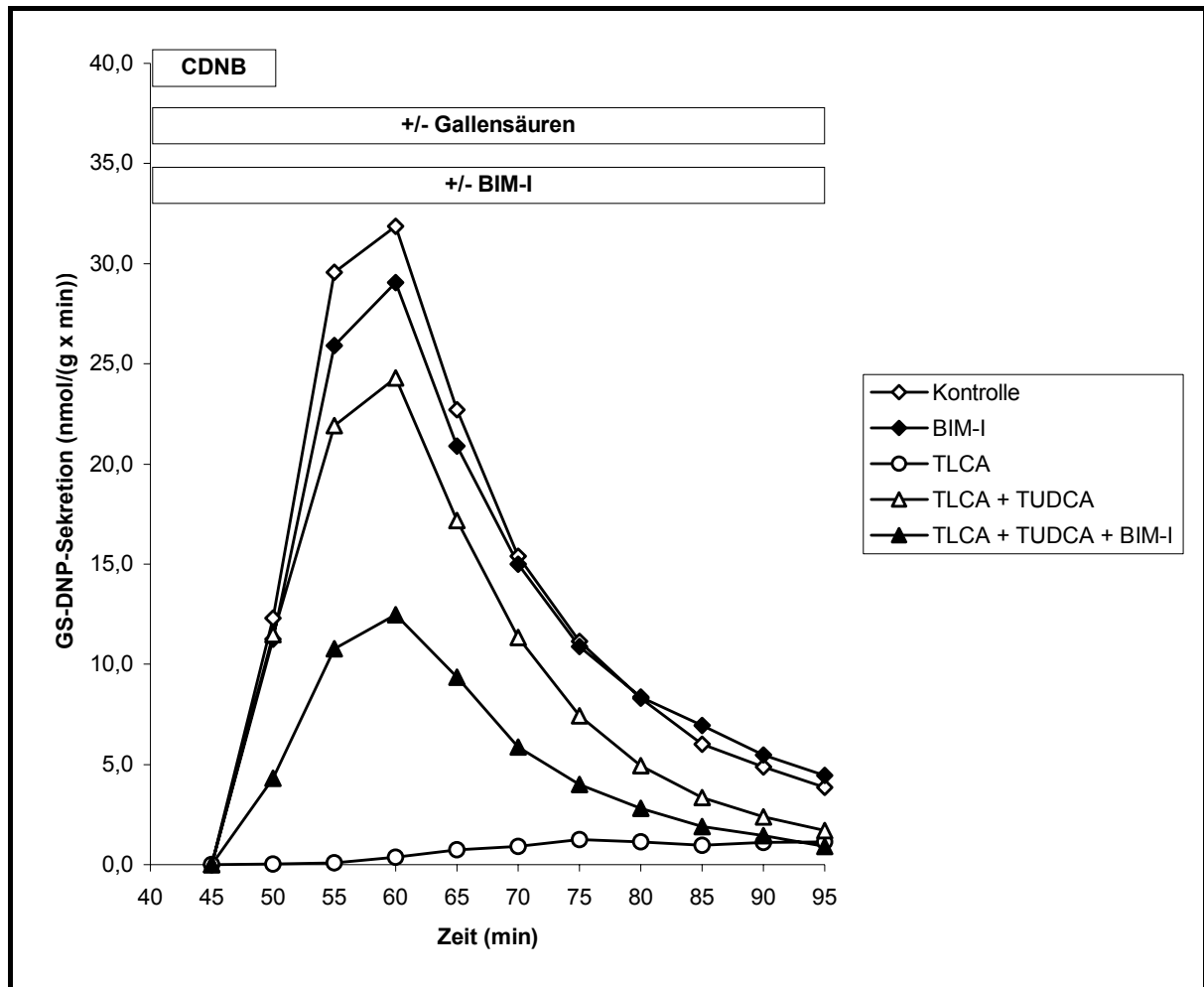


Abb. 42: Modulation der biliären GS-DNP-Sekretion (MW, n = 3 – 5).

3.3.3 Aktivität der LDH

Sowohl bei Kontrollen als auch bei Gabe von TLCA und TUDCA konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der LDH-Abgabe in das Effluat in Abhängigkeit von einer PKC-Hemmung beobachtet werden (siehe **Tabelle 31** und **Abb. 43**).

Die Aktivitäten entsprachen weitgehend den in **3.2.3** beschriebenen Verhältnissen.

Gruppe	LDH-Aktivität (mU/(g x min))		
	45 min	65 min	85 min
L: Kontrolle, n = 5.	3,7 ± 1,4	6,0 ± 8,9	4,0 ± 0,9
V: BIM-I, n = 3.	2,1 ± 0,5	3,4 ± 1,1	3,4 ± 1,1
R: TLCA + TUDCA, n = 5.	59,5 ± 21,2	44,2 ± 3,8	55,9 ± 7,5
W: BIM-I + TLCA + TUDCA, n = 3.	57,0 ± 25,6	60,1 ± 34,3	83,3 ± 14,6

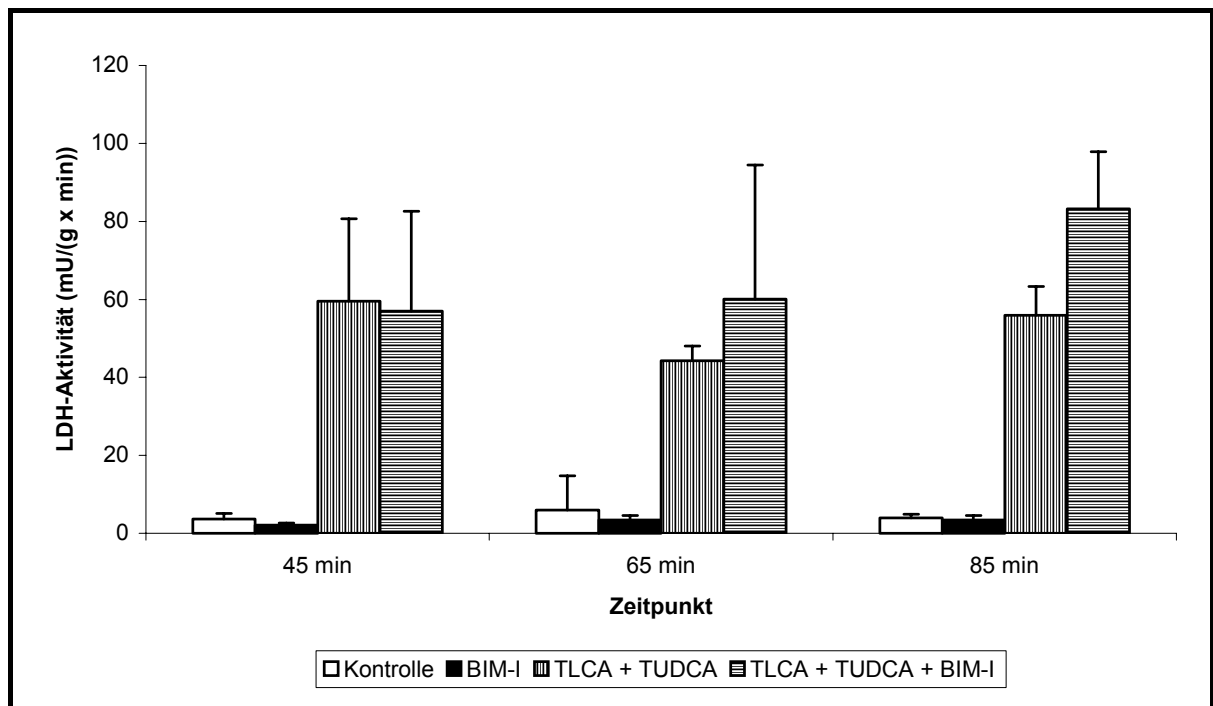


Abb. 43: LDH-Aktivität im Effluat (MW \pm SD, n = 3 – 5).

3.4 Hepatovenöser Efflux der Gallensäuren

Die Aufnahme der über die Pfortader applizierten Gallensäuren in die Leber wurde durch Messung der Konzentration der Gallensäuren im hepatovenösen Effluat mittels Gaschromatographie und, wenn erforderlich, mittels Massenspektrometrie bestimmt.

TLCA (**Gruppen C, D und E**) und TUDCA (**Gruppen F und G**) wurden bei einmaliger Leberpassage nahezu vollständig aufgenommen.

Bei der kombinierten Verabreichung von TLCA und TUDCA (**Gruppen H und I**) fiel auf, daß die UDCA-Spiegel im Effluat insgesamt etwas höher waren als bei alleiniger TUDCA-Applikation.

TCDCA wurde nach 65 min zu 97 % (**Gruppe J**) und 92 % (**Gruppe K**) und nach 85 min zu 90 % (**Gruppe J**) und 71 % (**Gruppe K**) aufgenommen. Die Aufnahme von TCDCA war bei den Gruppen des Versuchsprotokolls II (**Gruppen T und U**) bei etwa vergleichbaren Zeitpunkten tendenziell niedriger als in den entsprechenden Gruppen von Versuchsprotokoll I (**Gruppen J und K**). TCDCA wurde nach 45 min zu 84 % (**Gruppen T und U**) und nach 65 min zu 62 % (**Gruppe T**) und 58 % (**Gruppe U**) aufgenommen (siehe **Tabelle 32**).

In 31 von 40 Gaschromatogrammen von TCDCA-Versuchen konnten neben den Peaks von CDCA und internem Standard Peaks mit einer Retentionszeit etwa 0,5 min vor der CDCA detektiert werden (siehe **Abb. 44**). Diese Retentionszeit entspricht der $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure. Um Meßfehler auszuschließen, wurden stichprobenartig Untersuchungen der jeweiligen Proben mit der Massenspektrometrie als zweite Methode angeschlossen (siehe **Abb. 45**). Diese bestätigte $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure als Ursache des Peaks. Da eine quantitative Bestimmung der $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure im Effluat wegen einer fehlenden Eichung des Gaschromatographen auf diese Gallensäure nicht möglich war, beschränkt sich **Tabelle 32** auf eine qualitative Darstellung.

Tabelle 32: Hepatovenöser Efflux der Gallensäuren.	
Gruppe	Anzahl der Proben, in denen die jeweilige Gallensäure nachweisbar war; Konzentration in diesen Proben (MW ± SD).
C: TLCA.	LCA: 65 min: 0/6. 85 min: 0/6.
D: Wortmannin 100 nM + TLCA.	LCA: 65 min: 2/6; 0,24 ± 0,01 µM. 85 min: 0/6.
E: Wortmannin 500 nM + TLCA.	LCA: 65 min: 1/5; 0,21 µM. 85 min: 0/4.
F: TUDCA.	UDCA: 65 min: 1/5; 0,33 µM. 85 min: 4/5; 0,32 ± 0,08 µM.
G: Wortmannin 100 nM + TUDCA.	UDCA: 65 min: 3/5; 0,75 ± 0,63 µM. 85 min: 4/5; 0,56 ± 0,42 µM.
H: TLCA + TUDCA.	LCA: 65 min: 0/5. 85 min: 2/5; 0,29 ± 0,06 µM. UDCA: 65 min: 4/5; 0,90 ± 0,68 µM. 85 min: 5/5; 2,79 ± 3,71 µM.
I: Wortmannin 100 nM + TLCA + TUDCA.	LCA: 65 min: 0/5. 85 min: 0/5. UDCA: 65 min: 1/5; 1,63 µM. 85 min: 4/5; 0,72 ± 0,75 µM.
J: TCDCA.	CDCA: 65 min: 4/5; 0,84 ± 0,47 µM. 85 min: 5/5; 2,41 ± 1,21 µM. 3 α ,7 α -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure: 65 min: 1/5. 85 min: 5/5.
K: Wortmannin 100 nM + TCDCA.	CDCA: 65 min: 5/5; 1,90 ± 1,32 µM. 85 min: 5/5; 7,35 ± 3,11 µM. 3 α ,7 α -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure: 65 min: 2/5. 85 min: 5/5.
T: TCDCA.	CDCA: 45 min: 5/5; 4,03 ± 3,13 µM. 65 min: 5/5; 9,59 ± 2,82 µM. 3 α ,7 α -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure: 45 min: 5/5. 65 min: 5/5.
U: Wortmannin 100 nM + TCDCA.	CDCA: 45 min: 5/5; 4,02 ± 3,46 µM. 65 min: 5/5; 10,41 ± 1,53 µM. 3 α ,7 α -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure: 45 min: 3/5. 65 min: 5/5.

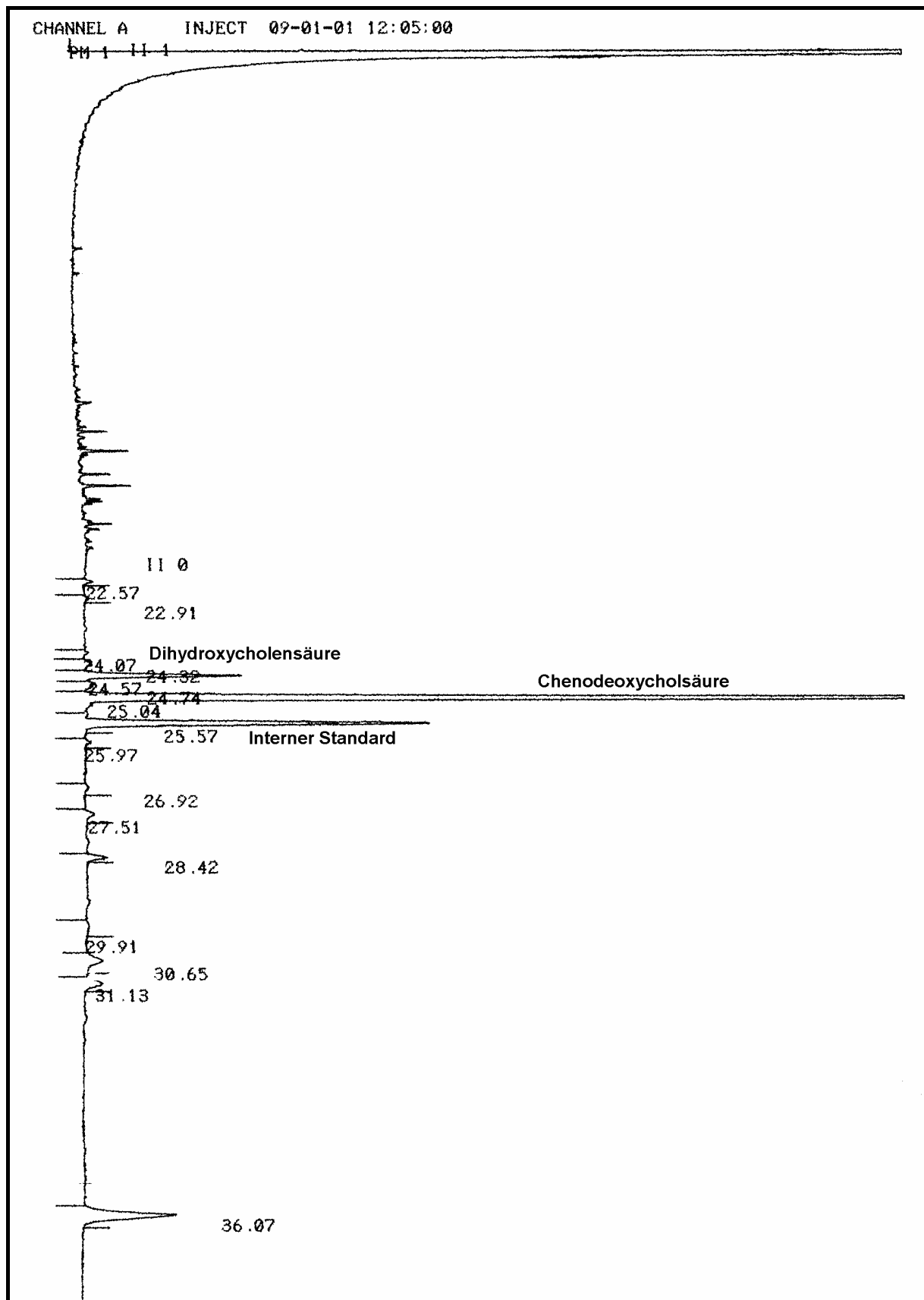


Abb. 44: Gallensäurenspiegel im hepatovenösen Effluat. Gaschromatogramm eines Effluatextrakts (Versuch C32, TCDCA, 65 min): Nachweis von CDCA (9,8 μM) und $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure (qualitativ).

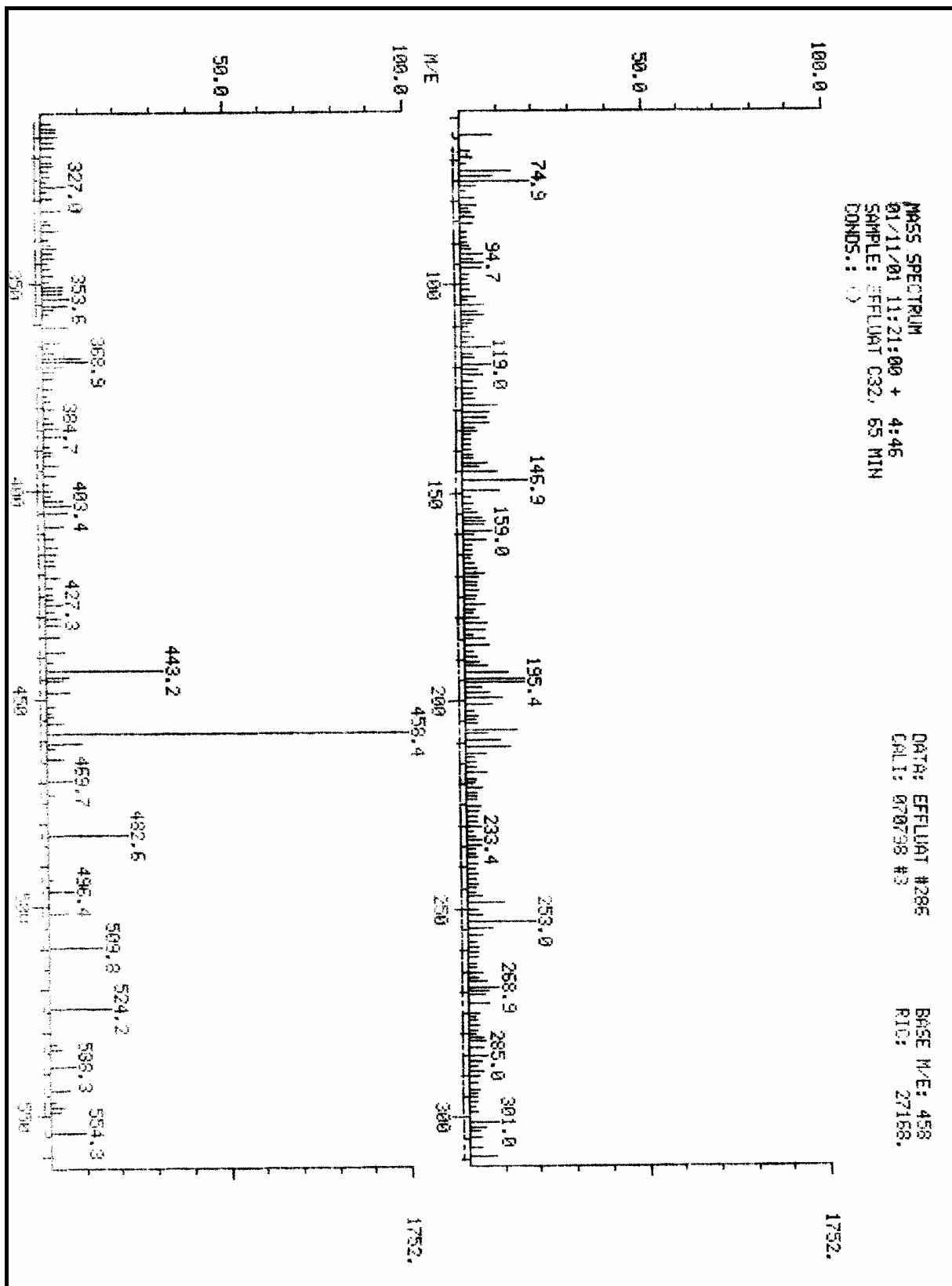


Abb. 45: Gallensäuren im hepatovenösen Effluat. Massenspektrometrische Untersuchung eines Effluatextrakts (Versuch C32, TCDCA, 65 min). Nachweis von $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure.

3.5 Autoradiographischer Nachweis der PI₃-Kinase-Aktivität

Die modulierende Wirkung der Gallensäuren TLCA und TUDCA auf die Aktivität der PI₃-Kinase in pcDNA 3.1/Ntcp-transfizierten Hep G2-Zellen wurde mittels eines PI₃-Kinase-Aktivitätsassays untersucht.

Während der PI₃-Kinase-Aktivator Insulin ($41,8 \times 10^{-6}$ I.E., 30 min) zu einer Erhöhung der PI₃-Kinase-Aktivität führte, bewirkten TLCA (25 μ M, 30 min) und TUDCA (25 μ M, 30 min) keine signifikante Aktivitätszunahme gegenüber Kontrollen (siehe **Tabelle 33** und **Abb. 46** und **47**).

Assay-Nummer	Kontrolle	Insulin	TLCA	TUDCA
1	1,00	1,57	0,81	1,85
2	1,00	1,86	1,53	0,74
3	1,00	1,36	0,73	0,75
MW \pm SD	1,00 \pm 0	1,60 \pm 0,25 *	1,02 \pm 0,44	1,11 \pm 0,64

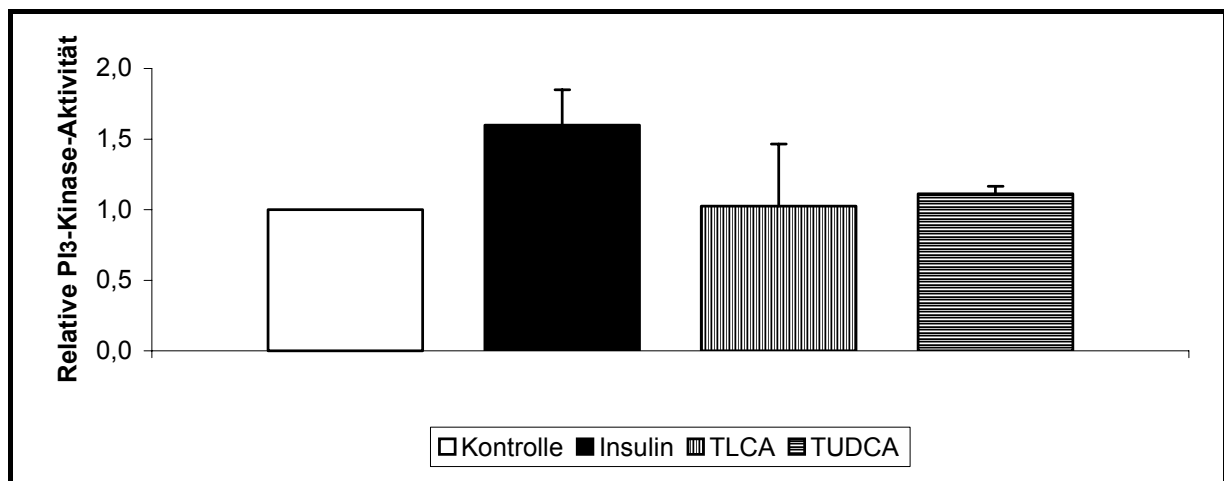


Abb. 46: Relative PI₃-Kinase-Aktivität in Bezug auf Kontrollen (MW \pm SD, n = 3). Mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt transfizierte humane Hep G2-Hepatomzellen wurden für 30 min mit Trägermedium (Kontrolle, DMSO 0,1 % v/v), Insulin (Positivkontrolle, $41,8 \times 10^{-6}$ I.E.), TLCA (25 μ M) oder TUDCA (25 μ M) inkubiert. Die PI₃-Kinase-Aktivität wurde nach Schockfrieren im Zellhomogenat (siehe **2.8**) bestimmt.

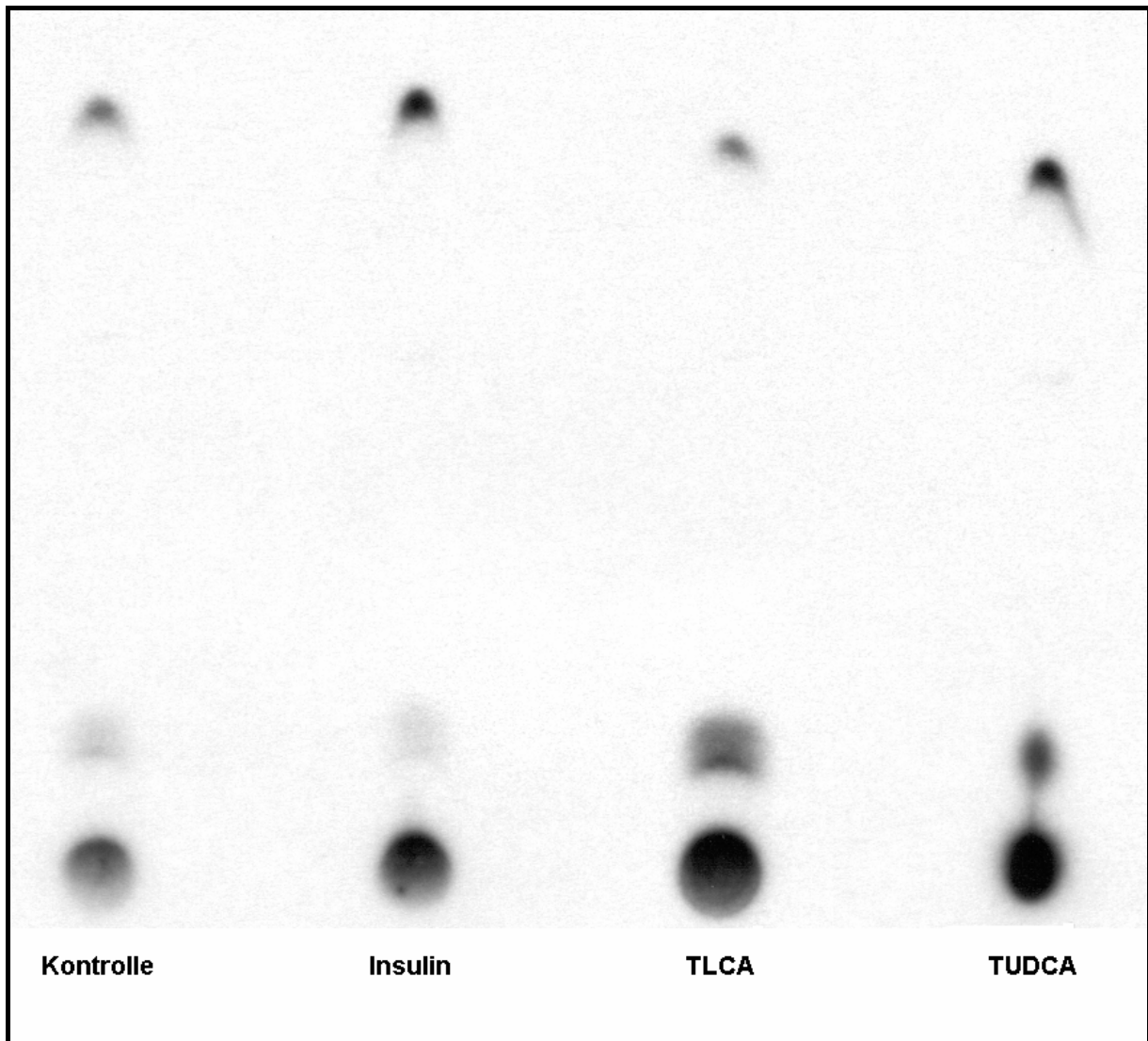


Abb. 47: Autoradiographischer Nachweis der PI₃-Kinase-Aktivität in mit einem pcDNA 3.1/Ntcp-Konstrukt transfizierten humanen Hep G2-Hepatomzellen nach dünnschichtchromatographischer Trennung des PI₃-Kinase-Produkts Phosphatidylinositol-3-Phosphat (oberste Schwärzungen). Die untersten Schwärzungen entsprechen den Auftragsstellen von Trägermedium (Kontrolle, DMSO 0,1 % v/v, 30 min), Insulin ($41,8 \times 10^{-6}$ I.E., 30 min), TLCA (25 μ M, 30 min) und TUDCA (25 μ M, 30 min).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung von PI₃-Kinasen für die durch Gallensäuren induzierte Modulation von Gallenfluß, hepatobiliärer Exozytose, Sekretion von organischen Anionen und Verteilung der PKC-Isoform ϵ in der perfundierten Rattenleber. Die Ergebnisse zeigen, daß die cholestatischen Effekte der hydrophoben Gallensäure TLCA über PI₃-Kinase-abhängige Mechanismen vermittelt werden und durch den PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin hemmbar sind. Demgegenüber wird die anticholestatische Wirkung der hydrophilen Gallensäure TUDCA PI₃-Kinase-unabhängig über α -PKC-abhängige Mechanismen vermittelt.

4.1 Modulation von Gallenfluß, hepatobiliärer Exozytose, biliärer GS-DNP-Sekretion und Verteilung der PKC-Isoform ϵ durch Gallensäuren

Seit über 35 Jahren ist bekannt, daß die hydrophobe Gallensäure LCA und ihr Konjugat TLCA cholestatisch wirken (55, 58). Zahlreiche Untersuchungen haben sich seither mit der Frage beschäftigt, wie der cholestatische Effekt der LCA in der Leber vermittelt wird. TLCA scheint selektiv die kanalikuläre Membran zu schädigen, wobei deren Fluidität wie auch die Zahl der Mikrovilli abnimmt (61, 62). Ferner behindert TLCA den transzellulären Vesikeltransport (73) und die Vesikelfusion am apikalen Pol der Leberzelle (17). Die ebenfalls reduzierte biliäre Sekretion organischer Anionen (94) kann zumindest partiell auf eine Verringerung der Mrp2-Dichte an der kanalikulären Membran durch TLCA zurückgeführt werden (16, 17). Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die der durch TLCA induzierten Cholestase zugrunde liegen, blieben aber weitgehend unverstanden.

Beuers et al. beobachteten in den neunziger Jahren, daß die hydrophile und anticholestatisch wirkende Gallensäure TUDCA die hepatobiliäre Exozytose über Kalzium- und wahrscheinlich α -PKC-abhängige Mechanismen stimuliert (10, 13). Sie

spekulierten, daß UDCA-Konjugate die sekretorische Kapazität cholestatischer Hepatozyten über die Insertion kanalikulärer Transportproteine in ihre Zielmembran fördern könnten (10, 13). Kürzlich gelang der experimentelle Nachweis für diese Vermutung, als gezeigt wurde, daß TUDCA bei der cholestativen Rattenleber die hepatobiliäre Exozytose, die Insertion des multispezifischen organischen Anionentransporters Mrp2 in die apikale Membran und die biliäre Sekretion organischer Anionen und damit den Gallenfluß über PKC-abhängige Mechanismen stimuliert (17).

In isolierten Hepatozyten induziert TUDCA über die Entleerung von IP_3 -sensitiven mikrosomalen Kalziumspeichern unabhängig von IP_3 (9, 19) und über eine Stimulation des Kalziumeinstroms über die Plasmamembran durch nickelsensitive Kalziumkanäle (9, 10, 19) anhaltende Anstiege des zytosolischen freien Kalziums. Zusätzlich transloziert TUDCA die kalziumsensitive α -Isoform der PKC, ein Schlüsselenzym der kalziumstimulierten Exozytose (28), an die hepatozellulären Membranen (11, 20, 108), induziert einen Anstieg des physiologischen intrazellulären PKC-Aktivators DAG und aktiviert membrangebundene PKC (13).

Im Gegensatz dazu scheint die hydrophobe und cholestativ wirkende Gallensäure TLCA den Kalziumeinstrom über die Plasmamembran der Leberzelle in höheren mikromolaren Konzentrationen zu behindern (9, 15, 33). Ein Einstrom von Kalzium gilt als wesentliches Signal für die Stimulation regulierter Exozytose in zahlreichen sekretorisch aktiven Zellen. Zudem transloziert TLCA selektiv die kalziumunabhängige ε -Isoform der PKC an die kanalikuläre Hepatozytenmembran (16), induziert einen Anstieg des hepatozellulären DAG-Spiegels und aktiviert membrangebundene PKC in isolierten Hepatozyten (13, 16). Eine Aktivierung von ε -PKC wurde als Signal für eine Störung des Einbaus von Proteinen in ihre Zielmembran bei Untersuchungen an einer Kolontumorzelllinie diskutiert (96). Daher wurde von Beuers et al. spekuliert, daß eine Aktivierung der ε -PKC im Zusammenhang mit der durch TLCA induzierten Hemmung der hepatozellulären Sekretion stehen könnte (16). Es war aber unklar, auf welchem Wege TLCA ε -PKC an kanalikulären Membranen selektiv aktivieren könnte.

Basierend auf der Entdeckung der PI_3 -Kinasen vor über zehn Jahren wurde das Konzept eines intrazellulären Signalsystems entwickelt, das Lipidmediatoren miteinbezog (111). Die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol an der D3-Position mit Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat durch PI_3 -Kinasen wurde als erstes in einem Komplex aus viralem Src und Middle-T-Antigen des Polyoma-Virus beschrieben (118).

Etwa zur gleichen Zeit wurde Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat in aktivierten, nicht aber in ruhenden Neutrophilen entdeckt, ein bis dahin nicht bekanntes Phospholipid (113). Das für die Bildung dieses Lipids verantwortliche Enzym wurde später gewonnen und erwies sich als verantwortlich für die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4-Phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (111).

Folgende Beobachtungen wiesen darauf hin, daß diese Lipide als Mediatoren wirken:

1. Sie fehlten in nichtstimulierten Zellen, akkumulierten jedoch schnell nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Agonisten.
2. Eine Inhibition der Bildung dieser Lipide resultierte in einer Hemmung vieler akuter zellulärer Antworten (111).

Obwohl es schon seit längerem schien, daß PI_3 -Kinasen an einer Reihe von Zellantworten beteiligt sind, haben unlängst drei Entdeckungen das Interesse an diesem Signalweg verstärkt: 1. Es konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung der PI_3 -Kinasen bei verschiedenen Zelltypen Apoptose verhinderte (39). 2. Es wurde eine von einem Retrovirus kodierte PI_3 -Kinase gefunden, die Hämangiosarkome bei Hühnern zu verursachen und Fibroblasten zu transformieren scheint (26). 3. Mutationen im PI_3 -Kinase-Gen verursachten bei *Caenorhabditis elegans* eine dreifache Verlängerung der Lebenszeit (79).

PI_3 -Kinasen modulieren die Aktivität einer Vielzahl von für zelluläre Transportprozesse wichtigen Kinasen (115). Auch der Einfluß von PI_3 -Kinasen auf die Isoformen der PKC wurde untersucht. In mit Baculovirus infizierten Insektenzellen konnte beobachtet werden, daß die PI_3 -Kinase-Produkte Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat die PKC-Isoform

ε aktivieren (110). In Hep G2-Zellen führte die Aktivierung einer Mutante des Rezeptors für PDGF, die PI₃-Kinasen aktiviert, zu einer Translokation der PKC-Isoform ε vom Zytosol an die Zellmembran. Diese Translokation wurde in Gegenwart des PI₃-Kinase-Inhibitors Wortmannin gehemmt. Damit im Einklang wurde die PKC-Isoform ε *in vitro* durch das synthetisch hergestellte PI₃-Kinase-Produkt Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat aktiviert (78).

Unter dem Eindruck dieser Erkenntnisse lag es nahe, eine Mediatorfunktion von PI₃-Kinasen für die Modulation der Aktivität und Verteilung von PKC-Isoformen und die damit möglicherweise verbundene Modulation der Sekretionskapazität der Leberzellen durch cholestatisch und anticholestatisch wirkende Gallensäuren zu untersuchen.

Um Aufschluß über die Bedeutung der PI₃-Kinase-Aktivität für die Modulation hepatozellulärer Sekretion und PKC-vermittelter Signalgebung zu bekommen, wurde das experimentelle Modell der isoliert perfundierten Rattenleber gewählt. Die PI₃-Kinase-Aktivität wurde durch den selektiven, nichtkompetitiven Inhibitor Wortmannin gehemmt (88).

4.1.1 Effekt von Wortmannin

Der PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin hatte unter Kontrollbedingungen ohne Zugabe von Gallensäuren in die Pfortader keinen Einfluß auf den Gallenfluß (siehe **3.1.1.1** und **3.2.1.1**). Die biliäre Sekretion von HRP als ein Maß für die hepatobiliäre Exozytose der mit HRP vorbeladenen Leber wurde durch Gabe von Wortmannin signifikant stimuliert (siehe **3.1.2.1**).

Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den in einer früheren Arbeit beschriebenen Effekten (38). Folli et al. berichteten 1997 bei der nichtstimulierten, perfundierten Rattenleber von einer 25prozentigen Abnahme des Gallenflusses und einer signifikanten Verringerung der biliären HRP-Sekretion bei Gabe von Wortmannin im Vergleich zu Kontrollen. Auf Grund des von Folli et al. verwendeten

Versuchsprotokolls (Applikation von Wortmannin von der 10. bis zur 90. min und von HRP von der 20. bis zur 45. min) können diese allerdings keine Aussage über die Exozytose machen. Der Transport von HRP von den Endästen der Pfortader über die Leberzelle in den Gallenkanalikus umfaßt drei Schritte: 1. Die Endozytose an der basalen Membran, 2. die intrazelluläre Transzytose und 3. die apikale Exozytose. Der von Folli et al. verwendete Versuchsansatz erlaubt eine Aussage über den HRP-Transport vom Pfortaderblut in die Galle, der offensichtlich in den mit Wortmannin behandelten Lebern geringer war. In der vorliegenden Arbeit wurde die Leber vor der Wortmanninapplikation mit HRP vorbeladen. Daher konnte Wortmannin nicht die HRP-Aufnahme in die Hepatozyten beeinflussen. Zudem war der transzelluläre Transport schon fortgeschritten.

Insofern könnte man spekulieren, daß eine Hemmung der PI_3 -Kinase zwar die endozytotische Aufnahme im von Folli et al. verwendeten Versuchsansatz behindert, die Exozytose jedoch stimuliert, was nur in dem hier gewählten Versuchsansatz erkennbar werden kann. Der in der vorliegenden Arbeit tendenziell höhere Gallenfluß bei Hemmung der PI_3 -Kinase könnte auf einer kolloidosmotischen Sogwirkung der HRP infolge erhöhter biliärer Sekretion der mit HRP vorgeladenen Leber beruhen.

Exozytose ist eine Verschmelzung eines Vesikels mit einer Zielmembran. Dies führt nicht nur zu einer Entleerung des Vesikelinhalts in den extramembranösen Raum (in der vorliegenden Arbeit also die Sekretion der HRP in das kanalikuläre Lumen), sondern auch – was funktionell für die sekretorische Kapazität der Leber sogar wichtiger ist – zu einer Insertion von Transportproteinen in ihre Zielmembran nach einer Beförderung an den Ort ihrer Wirkung durch Vesikel (22, 35). Kürzlich wurde gezeigt, daß Vesikel, die polymere Immunglobulin A-Rezeptoren durch die Leberzelle transportieren, gleichzeitig zwei der Schlüsseltransportproteine, Mrp2 und die Gallensalzexportpumpe Bsep, an die kanalikuläre Membran befördern (104). Der transzytotische Transport von polymeren Immunglobulin A-Rezeptoren und von HRP wurde auf eine identische Untergruppe von Vesikeln innerhalb der Leberzelle kolokalisiert (3).

Zusammenfassend scheint sich in nichtstimulierten Leberzellen eine Basisaktivität der PI_3 -Kinase zu finden (dies wurde zusätzlich durch den PI_3 -Kinase-Aktivitätsassay

in **3.5** belegt). Diese Grundaktivität scheint einen hemmenden Effekt auf die hepatozelluläre Exozytose zu haben, während eine meßbare Beeinflussung der Anionen- und Gallensekretion in dem hier gewählten Versuchsansatz nicht beobachtet wurde. Die Verteilung der PKC-Isoform ϵ wurde ebenfalls nicht meßbar beeinflusst (siehe **3.1.4**).

4.1.2 Effekt von TLCA

Wie bereits in der Vergangenheit beschrieben (17) kam es unter dem Einfluß von TLCA zu einer raschen Abnahme des Gallenflusses. In Gegenwart von Wortmannin war diese signifikant geringer (siehe **3.1.1.2**).

Im Einklang mit früheren Studien (17) kam es ohne zusätzliche Applikation von Wortmannin zu einer raschen Abnahme der hepatobiliären Exozytose nach TLCA-Gabe. Diese Verringerung war in Gegenwart von Wortmannin (100 nM) deutlich abgeschwächt. Bei einer Wortmanninkonzentration von 500 nM war überhaupt keine Abnahme der relativen HRP-Sekretion zu beobachten. Viel mehr kam es zu einem weiteren leichten Anstieg (siehe **3.1.2.2**).

Offensichtlich hatte die fünffach höhere Dosis von Wortmannin eine gänzliche Aufhebung der TLCA-Wirkung auf die hepatobiliäre Exozytose zur Folge, während sich bei einer Wortmanninkonzentration von 100 nM immer noch leichte Effekte seitens der TLCA erkennen ließen. Zwar berichten frühere Veröffentlichungen von einer dosisabhängigen Inhibition der PI_3 -Kinase-Aktivität von über 90 % bei 25 nM und einer IC_{50} von 12 nM (38), aber diese Messungen beziehen sich auf nichtstimulierte Zellen. 25 oder 100 nM Wortmannin mögen ausreichend sein, um die basale Aktivität der PI_3 -Kinase in der nichtstimulierten Leberzelle zu unterdrücken. Nimmt man jedoch an, daß die PI_3 -Kinase-Aktivität durch von außen zugeführte Substanzen wie im vorliegenden Fall TLCA verstärkt wurde, scheinen die genannten Konzentrationen nicht mehr ausreichend zu sein.

Während der mehrere Monate dauernden Meßphase wurden bedauerlicherweise Schwankungen der HRP-Basisaktivität beobachtet, die einen Vergleich zwischen

verschiedenen Versuchsgruppen erschweren. Besonders deutlich zeigte sich dieses Problem bei den zuletzt durchgeführten Versuchen der Gruppe E (Wortmannin 500 nM + TLCA, siehe **3.1.2.2**), bei denen die HRP-Sekretion vor der 45. min geringer war als in den Vergleichsgruppen. Den beobachteten Schwankungen der HRP-Gesamtaktivität könnte unter anderem die Verwendung von HRP unterschiedlicher Chargen desselben Herstellers zugrunde liegen. Die einzelnen Versuche wiesen jedoch trotz Schwankung der Gesamtaktivitäten ähnliche kinetische Verläufe innerhalb der jeweiligen Gruppe auf. Daher erschien die Berechnung der relativen HRP-Sekretion, bezogen auf das Intervall von der 40. bis zur 45. min, zum Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß TLCA über PI_3 -Kinase-abhängige Mechanismen den Gallenfluß, die hepatobiliäre Exozytose und damit die Transportkapazität der apikalen Pumpe Mrp2 zu behindern scheint.

Die signifikant höhere Transportkapazität von Mrp2 bei Hemmung der PI_3 -Kinase unterstützt diese These (siehe **3.2.2.2**), da kürzlich belegt werden konnte, daß TLCA nicht nur die hepatobiliäre Exozytose behindert, sondern auch die Dichte von Mrp2 an der hepatozellulären Membran deutlich verringert (17). Eine Verringerung der Dichte von Mrp2 hat konsequenterweise eine Abnahme der Transportkapazität apikaler Pumpen und somit die gezeigte Reduktion der GS-DNP-Sekretion zur Folge.

Der Membrananteil der PKC-Isoform ϵ war in Gegenwart von TLCA mit $52,4 \pm 5,3$ % vs. $42,6 \pm 5,8$ % bei Kontrollen signifikant erhöht (siehe **3.1.4**). Dies steht in gutem Einklang mit unlängst veröffentlichten Daten (16, 17) und belegt, daß TLCA selektiv die ϵ -Isoform der PKC an kanalikuläre Membranen der Hepatozyten transloziert.

Da das Antiserum gegen die PKC-Isoform ϵ keine vollständige Spezifität aufweist, waren zur genauen Lokalisation der richtigen Bande weitere Maßnahmen erforderlich. Zum einen wurde die ϵ -Bande über ihr Molekulargewicht (90 kDa) identifiziert, indem auf jedes Gel ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen wurde. Zum anderen wurde auf jedem Gel eine Rattenhirnzytosolpräparation aufgetragen, die reich an der PKC-Isoform ϵ ist. Zudem war in Voruntersuchungen an isolierten Rattenhepatozyten gezeigt worden, daß sowohl die hydrophobe Gallensäure TLCA

als auch der Phorbol-12-Myristat-13-Azetat zu einer Translokation der PKC-Isoform ϵ vom Zytosol an die Membran führten (16). Die in Hepatozyten isolierte und selektiv translozierbare „Proteinbande“ entsprach der nun im Lebergewebe identifizierten Bande. Darüber hinaus waren bei früheren Untersuchungen die Banden nach Inkubation mit Antiserum gegen ϵ -PKC in Gegenwart und Abwesenheit des Antigens verglichen worden. Auch damals war der ϵ -PKC ein Molekulargewicht von 90 kDa zugeordnet worden (16). Insofern sehen wir den Nachweis der PKC-Isoform ϵ mit der beschriebenen Methodik als ausreichend spezifisch an.

4.1.3 Effekt von TUDCA

Der choloretische Effekt von TUDCA (10) ließ sich durch Inhibition der PI_3 -Kinase nicht hemmen (siehe **3.1.1.3** und **3.2.1.3**).

Die hepatobiliäre Exozytose war bei PI_3 -Kinase-Hemmung tendenziell höher als ohne (siehe **3.1.2.3**). Unter Berücksichtigung der bisherigen Erkenntnisse wäre die tendenziell höhere Exozytose bei PI_3 -Kinase-Inhibition auch weniger auf eine Beeinflussung der TUDCA-Wirkung zurückzuführen als viel mehr als Folge der Modulation der zuvor diskutierten Basisaktivität zu sehen. Denn die Differenz der Flächen unter den Kurven (45. bis 95. min) der relativen HRP-Aktivitäten bei den TUDCA-Gruppen (\pm Wortmannin) lag mit 1569 A.E./50 min im Bereich der entsprechenden Differenz der Kontrollgruppen (\pm Wortmannin, 1987 A.E./50 min). Der fehlende Unterschied in Gegenwart und Abwesenheit von Wortmannin bei der Anionensekretion (siehe **3.2.2.3**) fügt sich in diese Beobachtungen ein.

Bezüglich der Verwendung relativer Werte bei der hepatobiliären HRP-Sekretion gilt das bereits unter **4.1.2** Diskutierte.

Die hydrophile Gallensäure TUDCA scheint unabhängig von PI_3 -Kinasen auf die Leberzelle einzuwirken.

4.1.4 Effekt der gemeinsamen Gabe von TLCA und TUDCA

In **3.1.1.4** konnte die bereits diskutierte Bedeutung der PI₃-Kinase auf den durch TLCA gehemmten Gallenfluß noch einmal gezeigt werden. Der Gallenfluß war bei den TLCA/TUDCA-Gruppen in Gegenwart von Wortmannin signifikant höher als ohne Hemmung der PI₃-Kinase.

Eine Aufhebung einer gallensäureninduzierten Cholestase durch UDCA-Konjugate wurde schon in einer Reihe von Studien belegt (17, 47, 63, 64, 75, 99). Der nun gezeigte Effekt von TUDCA auf die durch TLCA induzierte Reduktion des Gallenflusses untermauert diese vorausgehenden Studien (17, 75, 99).

Die Hemmung der PI₃-Kinase führte zusammen mit TUDCA nicht nur zu einer Aufhebung der cholestatischen Wirkung von TLCA, sondern zu einer deutlichen Steigerung des Gallenflusses. Dies kann durch eine Behinderung der Wirkung von TLCA durch Wortmannin in Ergänzung zu der bekannten choloretischen Wirkung der TUDCA, die, wie bereits diskutiert, nicht PI₃-Kinase-abhängig zu sein scheint, erklärt werden.

Entsprechend war auch die relative hepatobiliäre HRP-Sekretion bei der TLCA/TUDCA-Gruppe in Gegenwart von Wortmannin signifikant höher (siehe **3.1.2.4**).

Kürzliche Untersuchungen zeigten, daß vesikelmedierte Transportwege eine wichtige Rolle in der Modulation der sekretorischen Kapazität von Hepatozyten spielen (22, 35). In einer aktuellen Arbeit von Beuers et al. konnte zum ersten Mal die Hemmung der Exozytose, dem letzten Schritt des transzytotischen vesikulären Wegs, durch TLCA und die Aufhebung dieser Hemmung durch TUDCA gezeigt werden (17). Diese Ergebnisse waren nicht unerwartet, da schon zuvor eine Hemmung des transzytotischen Vesikeltransports in der Rattenleber durch die hydrophobe Gallensäure TLCA gezeigt worden war (73).

Die Mechanismen, über die Gallensäuren die Exozytose und somit die Insertion von Transportproteinen in ihre Zielmembranen modulieren, sind noch weitgehend

unverstanden. Unlängst konnte gezeigt werden, daß Gallensäuren starke modulierende Effekte auf eine Reihe von Signalwegen in isolierten Hepatozyten *in vitro* ausüben, die die Exozytose beeinflussen könnten. Dabei haben der zytosolische freie Kalziumspiegel, die cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-abhängige Proteinkinase A, die Isoformen der PKC und die mitogenaktivierten Protein (MAP)-Kinasen größere Beachtung erfahren (1, 9, 10, 13, 16, 19, 20, 21, 31, 32, 33, 97, 108). Bei den meisten dieser Studien wurden die Gallensäuren in mikromolaren Konzentrationen appliziert, die man beim Menschen auch *in vivo* antreffen kann.

Die Beobachtung, daß die hepatozelluläre Exozytose durch die hydrophile Gallensäure TUDCA in niedrigen mikromolaren Konzentrationen über einen kalziumabhängigen Weg stimuliert worden war, führte dazu, daß man einen Zusammenhang zwischen den durch TUDCA induzierten Effekten auf den zytosolischen Kalziumspiegel (9, 10, 19) und auf die kalziumsensitive PKC-Isoform α (13, 108), einem Schlüsselmediator der kalziumstimulierten Exozytose (28), und den Effekten auf die Exozytose (10, 13) herstellte. Dies war schon zuvor bei anderen sekretorischen Zellen gezeigt worden (24).

In isolierten Hepatozyten translozierte TLCA selektiv die kalziumunabhängige PKC-Isoform ε an die kanalikulären Membranen (16). Eine Rückverteilung der ε -Isoform in ein membranassoziertes Kompartiment wurde von einer Hemmung des Proteintargetings an die Zelloberfläche bei der Kolontumorzelllinie Caco-2 begleitet (96). Eine Translokation an hepatozelluläre Membranen stellt den entscheidenden Schritt bei der Aktivierung mobiler PKC-Isoformen dar (56).

Es war bereits bekannt, daß TUDCA bei durch TLCA induzierter Cholestase den erhöhten Membrananteil der PKC-Isoform ε verringert (17). Eine Beeinflussung durch PI₃-Kinasen war bislang nicht beschrieben. Durch die in **3.1.4** aufgeführten Ergebnisse konnte nun gezeigt werden, daß eine Hemmung der PI₃-Kinase eine Verminderung des Membrananteils der PKC-Isoform ε unterstützt. Der Einbau dieser PKC-Isoform in die apikale Membran durch TLCA scheint also durch PI₃-Kinasen vermittelt zu werden. Dieser Befund deckt sich mit Untersuchungen an Hep G2-Zellen, bei denen eine selektive Translokation von ε -PKC an Membranen durch PI₃-

Kinase-Stimulation beschrieben wurde (78). Bezüglich der Spezifität des Antikörpers gegen ϵ -PKC wird auf Abschnitt 4.1.2 der Diskussion verwiesen.

4.1.5 Effekt von TCDCA

Um die Bedeutung von PI_3 -Kinasen bei einer zweiten cholestatischen Gallensäure zu untersuchen, wurden Versuche mit TCDCA durchgeführt. Die stärkere Abnahme des Gallenflusses in den Gruppen nach Protokoll II (siehe 3.2.1.5) im Vergleich zu denen nach Protokoll I (siehe 3.1.1.5) könnte auf der zusätzlichen Applikation von BSA und HRP bei Versuchsprotokoll I beruhen. Andererseits kann ein experimentelles Problem nicht sicher ausgeschlossen werden, weil in der Vergangenheit die Gabe von BSA und HRP keine derartigen Interaktionen zeigte (10).

Ähnlich stellte sich die Situation bezüglich der hepatobiliären Sekretion sowohl von HRP (siehe 3.1.2.5) als auch von GS-DNP (siehe 3.2.2.5) dar. Letztere war tendenziell in der Gruppe mit Wortmannin etwas geringer, wobei der Unterschied jedoch nicht signifikant war.

Parameter der durch TCDCA modulierten Gallensekretion wurden durch Wortmannin nicht signifikant beeinflusst (siehe 3.1.1.5, 3.1.2.5, 3.2.1.5 und 3.2.2.5).

4.1.6 Effekt von BIM-I

Eine Mediatorfunktion der PKC-Isoformen für die durch Gallensäuren induzierte Modulation der hepatobiliären Exozytose und Gallensekretion wird durch die vorliegende Arbeit stark unterstützt. Der PKC-Inhibitor BIM-I wird im Vergleich zu Antagonisten wie Staurosporin oder H-7, die in der Vergangenheit häufig benutzt worden waren, als sehr spezifisch angesehen (74, 112). Die kalziumsensitive PKC-Isoform α ist besonders empfindlich für eine Blockade durch BIM-I. Die IC_{50} von BIM-I für die α -Isoform ist etwa 16mal geringer als für die ϵ -Isoform (74).

Die in **3.3.2.2** beschriebenen Versuche zeigen, daß eine Aufhebung der in der cholestatischen Leber gehemmten Sekretion organischer Anionen durch TUDCA von BIM-I blockiert wird. Dieses Ergebnis bestärkt die Hypothese, daß TUDCA die sekretorische Kapazität cholestatischer Leberzellen durch Kalzium- und α -PKC-abhängige Mechanismen steigert (10, 13).

Die Rolle der hepatozellulären α -PKC als wahrscheinlicher Mediator des anticholestatischen Effekts von TUDCA wurde kürzlich in Frage gestellt, als der mögliche Einfluß einer PI₃-Kinase-abhängigen Ras-Aktivierung auf die durch TUDCA induzierte hepatobiliäre Sekretion von Gallensäuren an der normalen Rattenleber und in kultivierten Rattenzellen untersucht wurde (68). Diese Untersuchung zeigte, daß TUDCA bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von 100 bis 500 μ M die hepatozelluläre PI₃-Kinase und das kleine GTP (Guanosintriphosphat)-bindende Protein Ras aktivierte und dadurch eine Aktivierung der MAP-Kinasen Extrazelluläre-Signal-regulierte Kinase-1 (Erk-1) und Erk-2 induzierte (97).

Diese Ergebnisse sind von Interesse, obwohl die Effekte einer hydrophoben Gallensäure nicht parallel untersucht wurden. Wie kürzlich berichtet, aktivierte die hydrophobe und cholestatisch wirkende Gallensäure Taurodeoxycholsäure die hepatozellulären MAP-Kinasen Erk-1 und Erk-2 mindestens genauso effektiv wie TUDCA in äquimolaren Konzentrationen (109). Eine Bedeutung der hepatozellulären PKC bei der durch TUDCA induzierten Gallensäuresekretion wurde auf Grund von Inhibitorstudien mit BIM-I in einer Konzentration von 50 nM als unwahrscheinlich angesehen (68). Die genannte Konzentration könnte jedoch zu niedrig gewesen sein, um die wahrscheinliche Bedeutung der PKC für den choleretischen und anticholestatischen Effekt von TUDCA am Modell der perfundierten Rattenleber zu erschließen. Daher ist es weiterhin nicht von der Hand zu weisen, daß TUDCA die sekretorische Kapazität der cholestatischen Leberzelle über die Aktivierung eines komplexen Signalsystems, in dem intrazelluläres Kalzium, die α -Isoform der PKC und MAP-Kinasen eng zusammenspielen, erhöhen könnte (14).

4.2 Hepatovenöse LDH-Aktivitäten

Die LDH ist ein Enzym, das die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Da die LDH in der Leberzelle in einer relativ hohen Konzentration vorkommt, führen Schädigungen von Hepatozyten *in vivo* zu erhöhten LDH-Aktivitäten im Blut bzw. im hepatovenösen Effluat. Somit eignet sich eine Bestimmung der LDH-Aktivität als Indikator für eine Schädigung der perfundierten Rattenleber (18, 102).

Gallensäuren sind amphipathische, potentiell toxische Substanzen. Erhöhte Konzentrationen von hydrophoben Gallensäuren in der Leber bewirken eine Schädigung dieses Organs und führen langfristig zu einer zirrhotischen Umwandlung. Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß Gallensäurenkonzentrationen, wie sie bei Cholestase auftreten, zu einer Apoptose der Hepatozyten führen können (84). Wenn auch nicht alle Gallensäuren toxisch sind, so bewirken dennoch schon kleinere Veränderungen des Gallensäureengerüsts dramatische Veränderungen bezüglich der Zytotoxizität. So löst zum Beispiel das Glyzinkonjugat der CDCA eine Apoptose von Hepatozyten *in vitro* aus, während das Taurinkonjugat in äquimolarer Konzentration keine Apoptose zur Folge hat (95).

Unlängst konnte gezeigt werden, daß Gallensäuren zytoplasmatische Proteinkinasekaskaden aktivieren und als Liganden für den nukleären Farnesoid X-Rezeptor fungieren (82). Dies wies darauf hin, daß sie ihre Effekte über Veränderungen zellulärer Signalkaskaden steuern könnten. Tatsächlich stellte sich bei der nichttoxischen Gallensäure TCA heraus, daß sie die PI₃-Kinase, einen wichtigen Aktivator von Überlebenssignalwegen (121), aktivierte (76). So könnte erklärt werden, warum manche nichttoxischen, aber hydrophoben Gallensäuren keine Apoptose auslösen. Rust et al. konnten kürzlich zeigen, daß die hydrophobe Gallensäure TCDCA einen PI₃-Kinase-abhängigen Überlebenssignalweg aktiviert, der ihrer potentiellen Zytotoxizität entgegenwirkt (95).

Die niedrigen LDH-Aktivitäten bei den Kontrollgruppen (siehe 3.1.3 und 3.2.3) sind ein Hinweis auf eine schonende und sachgerechte Präparations- und Perfusionstechnik, die sich physiologischen Bedingungen annähert.

Wortmannin zeigte keinen nennenswerten Effekt auf die LDH-Abgabe in der perfundierten Leber, damit scheint eine nennenswerte Schädigung nichtstimulierter Leberzellen durch Wortmannin unwahrscheinlich.

Die signifikant höhere LDH-Freisetzung bei Applikation von TLCA ohne Wortmannin im Vergleich zu einer TLCA-Exposition bei gleichzeitiger PI₃-Kinase-Hemmung (siehe **3.2.3**) steht in gutem Einklang mit der bereits postulierten PI₃-Kinase-Abhängigkeit des Wirkungsmechanismus der TLCA. Offensichtlich kann die TLCA ihre bekannte leberschädigende, zytotoxische Wirkung in Anwesenheit von Wortmannin nicht voll zur Geltung bringen.

Die hepatoprotektive Wirkung der hydrophilen Gallensäure TUDCA ist seit längerem bekannt (47). Das insgesamt niedrige Niveau der LDH-Aktivität fügt sich gut in diesen Rahmen (siehe **3.1.3** und **3.2.3**). Der Umstand, daß keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von Wortmannin auftraten, unterstützt zum einen die bereits diskutierte Unabhängigkeit des Wirkungsmechanismus der TUDCA von der PI₃-Kinase. Zum anderen weist er darauf hin, daß durch Veränderung der PI₃-Kinase-Aktivität an gegenüber TUDCA exponierten Leberzellen keine meßbare Beeinflussung der Zellintegrität stattfindet.

Bei den TLCA/TUDCA-Gruppen kam es in Abwesenheit von Wortmannin zu einem starken Anstieg der LDH-Aktivität im Effluat. Im Gegensatz dazu lagen die Werte bei einer Hemmung der PI₃-Kinase beinahe im Bereich der Kontrollversuche (siehe **3.1.3** und **3.2.3**).

Die Hemmung des cholestatischen Effekts von TLCA durch Wortmannin trägt vermutlich zu einer Verringerung der Zytotoxizität bei. Es ist aber unklar, ob dies die alleinige Erklärung für den zellprotektiven Effekt von Wortmannin in mit TLCA behandelten Lebern darstellt.

Die Applikation von Wortmannin führte in mit TCDCA behandelten Lebern im Gegensatz zu mit TLCA behandelten Lebern zu einer Aggravierung der Zellschädigung, gemessen an der LDH-Freisetzung (siehe **3.1.3**). Diese Effekte stehen in Einklang mit Beobachtungen von Rust et al., die eine durch TCDCA

induzierte Aktivierung eines PI_3 -Kinase-abhängigen Überlebenssignalwegs nachweisen konnten (95). Ein PI_3 -Kinase-abhängiger Überlebenssignalweg scheint nach den vorliegenden Ergebnissen damit einer durch TCDCA, nicht aber einer durch TLCA induzierten Leberzellschädigung entgegenzuwirken.

Der PKC-Inhibitor BIM-I beeinflusste die LDH-Freisetzung von mit TLCA und TUDCA behandelten Lebern nicht signifikant (siehe **3.3.3**).

4.3 Hepatovenöser Efflux der Gallensäuren

Es könnte argumentiert werden, daß TUDCA dem cholestatischen Effekt von TLCA an der perfundierten Rattenleber dadurch entgegenwirkt, daß TUDCA kompetitiv die sinusoidale Aufnahme der hydrophoben TLCA hemmt.

In der vorliegenden Studie zeigte die gaschromatographische Untersuchung der hepatovenösen Effluatate der TLCA/TUDCA-Gruppen auf LCA nach 65 min keine nachweisbaren Mengen dieser Gallensäure. Nach 85 min konnten in lediglich zwei von zehn Effluaten geringe Mengen von LCA nahe an der unteren Detektionsgrenze von 0,2 μ M gefunden werden. Genauso wurden jedoch bei den TLCA-Gruppen in drei von 17 Effluaten geringe Mengen an LCA nachgewiesen (siehe **3.4**). Da also die gleichzeitige Applikation von TLCA und TUDCA zu keinen nennenswerten Anstiegen des LCA-Spiegels in den Effluaten führte, also der weitaus überwiegende Anteil der TLCA in die Leber aufgenommen worden war, scheint eine kompetitive Hemmung der TLCA-Aufnahme durch TUDCA unwahrscheinlich. Dies steht auch in Einklang mit bisher unveröffentlichten Daten von Beuers et al.

Bei der Mehrheit der TUDCA-Versuche konnten kleinere Mengen an UDCA im Effluat nachgewiesen werden (siehe **3.4**). Diese Mengen waren jedoch im Verhältnis zur verabreichten TUDCA-Menge so gering (etwa 1 %), daß man von einer fast vollständigen TUDCA-Aufnahme in die Leberzellen ausgehen muß.

Anders stellte sich die Situation bei den TCDCA-Gruppen dar. CDCA konnte bis auf eine Ausnahme in allen Effluaten nachgewiesen werden. Im übrigen waren die nachgewiesenen Konzentrationen wesentlich höher als bei den anderen untersuchten Gallensäuren (siehe 3.4). Insofern muß von einer zumindest eingeschränkten Aufnahme der TCDCA ausgegangen werden, wobei die niedrigste Extraktionsrate aus der Pfortader bei 58 % lag. Dieser Befund steht in Einklang mit in der Literatur beschriebenen Extraktionsraten (53).

In Effluaten der TCDCA-Versuche wurde die Gallensäure $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure nachgewiesen. Da diese Gallensäure nicht appliziert worden war und in den Effluaten der anderen Versuchsgruppen, bei denen keine TCDCA verabreicht worden war, nicht nachgewiesen werden konnte, ist ein Zusammenhang mit der TCDCA-Gabe zu diskutieren. Da $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- Δ^5 -Cholensäure eine dehydrierte Form von CDCA/ $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- 5β -Cholsäure ist, erscheint eine partielle Umwandlung von TCDCA unter Einführung einer Δ^5 -Doppelbindung während der Perfusion naheliegend.

4.4 PI₃-Kinase-Assay

Um einen direkten Effekt von Gallensäuren auf die PI₃-Kinase nachweisen zu können, wurde ein PI₃-Kinase-Aktivitätsassay an Hep G2-Zellen durchgeführt. Hep G2-Zellen scheinen als Abkömmlinge einer menschlichen Hepatomzelle, die viele Eigenschaften der differenzierten menschlichen Leberzelle konserviert haben, ein akzeptables Modell für diese Fragestellung zu sein.

Das als PI₃-Kinase-Aktivator bekannte Insulin (95) zeigte im vorliegenden Assay eine signifikante Aktivierung der PI₃-Kinase. Dies kann als Beleg für die Eignung sowohl des Modells als auch des Assays gewertet werden.

Im Gegensatz dazu zeigten die Gallensäuren TLCA und TUDCA im PI₃-Kinase-Aktivitätsassay keine meßbare Beeinflussung der Aktivität dieses Enzyms (siehe 3.5).

Dies unterstützt nicht die Ergebnisse der beschriebenen Perfusionsversuche, die zeigen konnten, daß 1. die cholestatischen Effekte der hydrophoben Gallensäure TLCA über PI₃-Kinase-abhängige Mechanismen vermittelt werden und 2. die anticholestatische Wirkung der hydrophilen Gallensäure TUDCA PI₃-Kinase-unabhängig vermittelt wird. Kurz et al. beobachteten demgegenüber in Zellkulturen eine Steigerung der PI₃-Kinase-Aktivität durch TUDCA bei der unphysiologisch hohen Konzentration von 500 µM (68).

Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß der durchgeführte Assay mit dem verwendeten Anti-p110 α -Antikörper nur PI₃-Kinasen mit dem entsprechenden Antigen detektieren konnte. Dies ist lediglich ein Teil der Klasse I A-PI₃-Kinasen, die Isoformen β und δ werden nicht erfaßt (115). Insofern ist es durchaus denkbar, daß es durch TLCA zu einer Stimulation von PI₃-Kinasen gekommen ist, die mit der vorliegenden Methode nicht meßbar war.

Ein anderer Aspekt ist eine potentielle kompartimentäre Lokalisation dieses Enzyms in der Zelle. Auf diese Weise könnte eine PI₃-Kinase-Hemmung am apikalen Zellpol zu einer Förderung der hepatobiliären Exozytose führen (siehe 3.1.2). Eine subzelluläre Enzymaktivierung könnte einer Enzymaktivitätsmessung am Zellhomogenat entgehen.

Es könnte argumentiert werden, daß die Gallensäuren nicht in ausreichend hohen Konzentrationen in die Zellen gelangt sind und daher auch keine Effekte zeigen konnten. Glasova et al. beobachteten in Analogexperimenten, daß TUDCA in die verwendeten pcDNA 3.1/Ntcp-transfizierten Hep G2-Zellen in modulatorisch wirksamen Konzentrationen aufgenommen wurde (41). Insofern eignen sich pcDNA 3.1/Ntcp-transfizierte Hep G2-Zellen für Studien, die die hepatozelluläre Aufnahme von TUDCA voraussetzen, während nichttransfizierte Hep G2-Zellen Gallensäurekonjugate in nur geringen Mengen aufnehmen. Ob die cholestatisch wirkende Gallensäure TLCA über den natriumabhängigen Gallensäuretransporter Ntcp in die Leberzelle transportiert wird, ist bisher nicht untersucht. Ursache für die fehlende PI₃-Kinase-Stimulation durch TLCA in der vorliegenden Arbeit könnte demzufolge eine zu geringe intrazelluläre Konzentration von TLCA bei zu niedriger Aufnahme sein.

5 Zusammenfassung

Gallensäuren beeinflussen die Sekretionskapazität der Leber über transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsprozesse. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Bedeutung der hepatozellulären PI₃-Kinasen für die Modulation des Gallenflusses, der hepatobiliären Exozytose und der Sekretion organischer Anionen durch die hydrophile Gallensäure TUDCA und die hydrophoben, potentiell toxischen Gallensäuren TLCA und TCDCA am Modell der perfundierten Rattenleber. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der PI₃-Kinasen für die hepatozelluläre Verteilung der PKC-Isoform ϵ im Leberhomogenat mittels einer immunoelektrophoretischen Methode untersucht. Versuche mit dem selektiven PKC-Inhibitor BIM-I sollten die Bedeutung der kalziumsensitiven PKC-Isoform α für die anticholestatische Wirkung der TUDCA belegen. Durch die Bestimmung der LDH-Aktivität im Effluat wurde das Ausmaß der hepatischen Zellschädigung ermittelt. Durch gaschromatographische und massenspektrometrische Bestimmung der jeweiligen Gallensäuren im Effluat wurde die Gallensäureaufnahme in die Leber bestimmt. Um einen direkten Effekt von Gallensäuren auf die PI₃-Kinasen nachweisen zu können, wurde ein PI₃-Kinase-Aktivitätsassay an pcDNA 3.1/Ntcp-transfizierten Hep G2-Zellen durchgeführt. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

Bei Kontrollen wurde der Gallenfluß und die Transportkapazität der Konjugatexportpumpe Mrp2, dargestellt durch die biliäre GS-DNP-Sekretion, durch den PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin nicht beeinflusst. Die hepatobiliäre Exozytose, gemessen an der hepatobiliären HRP-Sekretion, wurde durch Wortmannin signifikant stimuliert. Dies deutet auf eine PI₃-Kinase-Basisaktivität in der nichtstimulierten Leberzelle hin, die die hepatobiliäre Exozytose einschränkt.

Die Hemmung von Gallenfluß, hepatobiliärer Exozytose und Sekretion organischer Anionen durch die hydrophobe Gallensäure TLCA wurde durch den PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin antagonisiert. Daraus kann gefolgert werden, daß die hydrophobe Gallensäure TLCA über PI₃-Kinase-abhängige Mechanismen die hepatobiliäre Exozytose und damit die Insertion apikaler Pumpen hemmt und die Gallensekretion beeinträchtigt.

Die Stimulation von Gallenfluß, hepatobiliärer Exozytose und Sekretion organischer Anionen durch die hydrophile Gallensäure TUDCA und deren Hemmung durch die hydrophobe Gallensäure TCDCA wurden durch den PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin nicht beeinflusst.

Der anticholestatische Effekt von TUDCA auf die durch TLCA induzierte Hemmung von Gallenfluß, hepatobiliärer Exozytose und organischer Anionensekretion wurde durch Wortmannin verstärkt. TUDCA und PI₃-Kinase-Hemmung wirkten damit additiv dem cholestatischen Effekt von TLCA entgegen.

Eine durch TLCA induzierte Bindung von ϵ -PKC an apikale Hepatozytenmembranen, die für den cholestatischen Effekt von TLCA mitverantwortlich gemacht wird, wurde durch Gabe von Wortmannin signifikant gesenkt. Damit konnte gezeigt werden, daß die Translokation von ϵ -PKC an die apikale Membran durch TLCA über PI₃-Kinasen vermittelt wird.

Die Stimulation der Sekretion organischer Anionen und des Gallenflusses durch TUDCA in der cholestatischen Leber wurde durch den α -PKC-Inhibitor BIM-I gehemmt. Dies weist auf die Mediatorfunktion der kalziumsensitiven PKC-Isoform α für die anticholestatische Wirkung der Gallensäure TUDCA hin.

Die durch TLCA induzierte Leberzellschädigung, gemessen an der hepatovenösen LDH-Freisetzung, konnte durch den PI₃-Kinase-Inhibitor Wortmannin vermindert werden.

Die Gallensäuren TUDCA und TLCA, bestimmt im hepatovenösen Effluat mittels gaschromatographischer und massenspektrometrischer Techniken, wurden im verwendeten Modell nahezu vollständig in die Leberzellen unabhängig von der PI₃-Kinase-Aktivität aufgenommen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die cholestatischen Effekte der hydrophoben Gallensäure TLCA über PI₃-Kinase-abhängige und möglicherweise ϵ -PKC-abhängige Mechanismen vermittelt werden. Demgegenüber wird die anticholestatische Wirkung der hydrophilen Gallensäure TUDCA PI₃-Kinase-unabhängig und zumindest partiell über Kalzium- und α -PKC-abhängige Mechanismen vermittelt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Anwer MS, Engelking LR, Nolan K, Sullivan D, Zimniak P, Lester R. Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca^{++} activity of isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1988; 8: 887 – 891.
- 2 Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses* 1986; 19: 57 – 69.
- 3 Barr VA, Hubbard AL. Newly synthesized hepatocyte plasma membrane proteins are transported in transcytotic vesicles in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 1993; 105: 554 – 571.
- 4 Baumgartner U, Schölmerich J, Sellinger M, Reinhardt M, Ruf G, Farthmann EH. Different protective effects of tauroursodeoxycholate, ursodeoxycholate, and 23-methyl-ursodeoxycholate against tauroolithocholate-induced cholestasis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 250 – 255.
- 5 Benedetti A, Strazzabosco M, Ng OC, Boyer JL. Regulation of activity and apical targeting of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 792 – 796.
- 6 Bergmeyer HU, Bernt E. Lactate dehydrogenase. In: *Methods of enzymatic analysis*. Band 3. Academic Press Inc., New York 1983: 574 – 579.
- 7 Beuers U, Fischer S, Spengler U, Paumgartner G. Formation of iso-ursodeoxycholic acid during administration of ursodeoxycholic acid in man. *J Hepatol* 1991; 13: 97 – 103.
- 8 Beuers U, Spengler U, Kruis W, Aydemir Ü, Wiebecke B, Heldwein W, Weinzierl M, Pape GR, Sauerbruch T, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid

- for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 1992; 16: 707 – 714.
- 9 Beuers U, Nathanson MH, Boyer JL. Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic Ca^{2+} signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1993; 104: 604 – 612.
 - 10 Beuers U, Nathanson MH, Isales CM, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca^{++} mechanisms defective in cholestasis. *J Clin Invest* 1993; 92: 2984 – 2993.
 - 11 Beuers U, Throckmorton DO, Anderson MH, Isales CM, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid induces translocation of α -, but not δ -, ϵ -, and ζ -protein kinase C in rat hepatocytes. *Hepatology* 1993; 18: 135A.
 - 12 Beuers U, Boyer JL. Bile: a historical review of studies on its form and function. In: Kirsner JB (Hrsg.). *Gastroenterology in the 20th century*. Lea & Febiger, New York, 1994: 267 – 288.
 - 13 Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS, Isales CM, Thasler W, Kullak-Ublick GA, Sauter G, Koebe HG, Paumgartner G, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1996; 110: 1553 – 1563.
 - 14 Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* 1998; 28: 1449 – 1453.
 - 15 Beuers U, Probst I, Soroka C, Boyer JL, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G. Concentration-dependent modulation of cytosolic free calcium and protein kinase C by tauroithochoic acid in isolated rat hepatocytes . In: Paumgartner G, Stiehl A, Keppler D, Gerok W, Leuschner U (Hrsg.). *Bile acids and cholestasis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1999: 151 – 155.

- 16 Beuers U, Probst I, Soroka C, Boyer JL, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G. Modulation of protein kinase C by tauroithocholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1999; 29: 477 – 482.
- 17 Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, 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* 2001; 33: 1206 – 1216.
- 18 Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Prolonged antagonism of α_1 -adrenergic vasoconstriction in the rat liver by atrial natriuretic peptide. *Gastroenterology* 1995; 108: 803 – 811.
- 19 Bouscarel B, Fromm H, Nussbaum R. Ursodeoxycholate mobilizes intracellular Ca^{2+} and activates phosphorylase a in isolated hepatocytes. *Am J Physiol* 1993; 264: G243 – G251.
- 20 Bouscarel B, Gettys TW, Fromm H, Dubner H. Ursodeoxycholic acid inhibits glucagon-induced cAMP formation in hamster hepatocytes: a role for PKC. *Am J Physiol* 1995; 268: G300 – G310.
- 21 Bouscarel B, Kroll SD, Fromm H. Signal transduction and hepatocellular bile acid transport: cross talk between bile acids and second messengers. *Gastroenterology* 1999; 117: 433 – 452.
- 22 Boyer JL, Soroka CJ. Vesicle targeting to the apical domain regulates bile excretory function in isolated rat hepatocyte couplets. *Gastroenterology* 1995; 109: 1600 – 1611.
- 23 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248 – 254.

- 24 Burgoyne RD, Morgan A. Regulated exocytosis. *Biochem J* 1993; 293: 305 – 316.
- 25 Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64: 281 – 302.
- 26 Chang HW, Aoki M, Fruman D, Auger KR, Bellacosa A, Tsichlis PN, Cantley LC, Roberts TM, Vogt PK. Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science* 1997; 276: 1848 – 1850.
- 27 Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4902 – 4911.
- 28 Chen YA, Duvvuri V, Schulman H, Scheller RH. Calmodulin and protein kinase C increase Ca^{2+} -stimulated secretion by modulating membrane-attached exocytic machinery. *J Biol Chem* 1999; 274: 26469 – 26476.
- 29 Christensen E, Altman DG, Neuberger J, De Stavola BL, Tygstrup N, Williams R, PBC1 and PBC2 trial groups. Updating prognosis in primary biliary cirrhosis using a time-dependent Cox regression model. *Gastroenterology* 1993; 105: 1865 – 1876.
- 30 Combes B, Carithers RL, Jr., Maddrey WC, Lin D, Mc Donald MF, Wheeler DE, Eigenbrodt EH, Munoz SJ, Rubin R, Garcia-Tsao G, Bonner GF, West AB, Boyer JL, Luketic VA, Shiffman ML, Mills AS, Peters MG, White HM, Zetterman RK, Rossi SS, Hofmann AF, Markin RS. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22: 759 – 766.
- 31 Combettes L, Dumont M, Berthon B, Erlinger S, Claret M. Release of calcium from the endoplasmic reticulum by bile acids in rat liver cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 2299 – 2303.

- 32 Combettes L, Berthon B, Doucet E, Erlinger S, Claret M. Characteristics of bile acid-mediated Ca^{2+} release from permeabilized liver cells and liver microsomes. *J Biol Chem* 1989; 264: 157 – 167.
- 33 Combettes L, Berthon B, Doucet E, Erlinger S, Claret M. Bile acids mobilise internal Ca^{2+} independently of external Ca^{2+} in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1990; 190: 619 – 623.
- 34 Crawford JM, Strahs DCJ, Crawford AR, Barnes S. Role of bile salt hydrophobicity in hepatic microtubule-dependent bile salt secretion. *J Lipid Res* 1994; 35: 1738 – 1748.
- 35 Crawford JM. Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 169 – 189.
- 36 Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making. *Hepatology* 1989; 10: 1 – 7.
- 37 Dickson ER, Murtaugh PA, Wiesner RH, Grambsch PM, Fleming TR, Ludwig J, La Russo NF, Malinchoc M, Chapman RW, Kaplan MM, Maddrey WC, Williams R, Farrant M, Langworthy A. Primary sclerosing cholangitis: refinement and validation of survival models. *Gastroenterology* 1992; 103: 1893 – 1901.
- 38 Folli F, Alvaro D, Gigliozzi A, Bassotti C, Kahn CR, Pontiroli AE, Capocaccia L, Jezequel AM, Benedetti A. Regulation of endocytic-transcytotic pathways and bile secretion by phosphatidylinositol 3-kinase in rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 954 – 965.
- 39 Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88: 435 – 437.

- 40 Galle PR, Theilmann L, Raedsch R, Otto G, Stiehl A. Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 1990; 12: 486 – 491.
- 41 Glasova H, Berghaus TM, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Beuers U. Carrier-mediated uptake is a prerequisite for tauroursodeoxycholic acid-induced translocation of protein kinase C α in human hepatoma cells. 2001 zur Publikation eingereicht.
- 42 Greim H, Trülzsch D, Roboz J, Dressler K, Czygan P, Hutterer F, Schaffner F, Popper H. Mechanism of cholestasis. 5. Bile acids in normal rat livers and in those after bile duct ligation. *Gastroenterology* 1972; 63: 837 – 845.
- 43 Greim H, Trülzsch D, Czygan P, Rudick J, Hutterer F, Schaffner F, Popper H. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 1972; 63: 846 – 850.
- 44 Güldütuna S, Zimmer G, Imhof M, Bhatti S, You T, Leuschner U. Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterology* 1993; 104: 1736 – 1744.
- 45 Häussinger D, Saha N, Hallbrucker C, Lang F, Gerok W. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem J* 1993; 291: 355 – 360.
- 46 Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CN, Michieletti P, Minuk GY, Pappas SC, Scully LJ, Steinbrecher UP, Sutherland LR, Williams CN, Witt-Sullivan H, Worobetz LJ, Milner RA, Wanless IR. The Canadian multicenter double-blind randomized controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19: 1149 – 1156.
- 47 Heuman DM, Mills AS, Mc Call J, Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular

- necrosis caused by more hydrophobic bile salts. In vivo studies in the rat. *Gastroenterology* 1991; 100: 203 – 211.
- 48 Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 1991; 14: 920 – 926.
- 49 Heuman DM, Bajaj R. Ursodeoxycholate conjugates protect against disruption of cholesterol-rich membranes by bile salts. *Gastroenterology* 1994; 106: 1333 – 1341.
- 50 Heuman DM. Disruptive and protective interactions of bile salts, cholesterol : lecithin vesicles, and canalicular membranes. In: Hofmann AF, Paumgartner G, Stiehl A (Hrsg.). *Bile acids in gastroenterology basic and clinical advances*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1995: 283 – 289.
- 51 Heuman DM, Bajaj RS, Lin Q. Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *J Lipid Res* 1996; 37: 562 – 573.
- 52 Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF, Hsuan JJ, Courtneidge SA, Parker PJ, Waterfield MD. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 1992; 70: 419 – 429.
- 53 Hofmann AF. Bile acids. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (Hrsg.). *The liver: biology and pathobiology*. 2. Auflage. Raven Press, New York, 1988: 553 – 572.
- 54 Hofmann AF. Bile acid hepatotoxicity and the rationale of UDCA therapy in chronic cholestatic liver disease: some hypotheses. In: Paumgartner G, Stiehl A, Barbara L, Roda E (Hrsg.). *Strategies for the treatment of hepatobiliary*

- diseases. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1990: 13 – 33.
- 55 Holsti P. Cirrhosis of the liver induced in rabbits by gastric instillation of 3-monohydroxycholanic acid. *Nature* 1960; 186: 250.
- 56 Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 1993; 291: 329 – 343.
- 57 Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J Biol Chem* 1998; 273: 1684 – 1688.
- 58 Javitt NB. Cholestasis in rats induced by tauroolithocholate. *Nature* 1966; 210: 1262 – 1263.
- 59 Jazrawi RP, De Caestecker JS, Goggin PM, Britten AJ, Joseph AEA, Maxwell JD, Northfield TC. Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1994; 106: 134 – 142.
- 60 Joly M, Kazlauskas A, Fay FS, Corvera S. Disruption of PDGF receptor trafficking by mutation of its PI-3 kinase binding sites. *Science* 1994; 263: 684 – 687.
- 61 Kakis G, Yousef IM. Pathogenesis of lithocholate- and tauroolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology* 1978; 75: 595 – 607.
- 62 Kakis G, Phillips MJ, Yousef IM. The respective roles of membrane cholesterol and of sodium potassium adenosine triphosphatase in the pathogenesis of lithocholate-induced cholestasis. *Lab Invest* 1980; 43: 73 – 81.
- 63 Kitani K, Kanai S. Tauroursodeoxycholate prevents taurocholate induced cholestasis. *Life Sci* 1982; 30: 515 – 523.

- 64 Kitani K, Ohta M, Kanai S. Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat. *Am J Physiol* 1985; 248: G407 – G417.
- 65 Kitani K. Hepatoprotective effect of ursodeoxycholate in experimental animals. In: Paumgartner G, Stiehl A, Barbara L, Roda E (Hrsg.). *Strategies for the treatment of hepatobiliary diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1990: 43 – 56.
- 66 Koh JS, Lieberthal W, Heydrick S, Levine JS. Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Clin Invest* 1998, 102: 716 – 727.
- 67 Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 2000; 32 (suppl. 1): 3 – 18.
- 68 Kurz AK, Block C, Graf D, Dahl S vom, Schliess F, Häussinger D. Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Biochem J* 2000; 350: 207 – 213.
- 69 Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Güldütuna S, Hübner K, Hellstern A, Gatzert M, Leuschner M. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989; 97: 1268 – 1274.
- 70 Lindor KD, Dickson ER, Baldus WP, Jorgensen RA, Ludwig J, Murtaugh PA, Harrison JM, Wiesner RH, Anderson ML, Lange SM, Le Sage G, Rossi SS, Hofmann AF. Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 106: 1284 – 1290.
- 71 Lindor KD. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 691 – 695.

- 72 Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* 1997; 406: 75 – 78.
- 73 Marinelli RA, Roma MG, Pellegrino JM, Rodriguez Garay EA. Tauroolithocholate-induced inhibition of biliary lipid and protein excretion in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1125: 44 – 48.
- 74 Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 1993; 268: 9194 – 9197.
- 75 Milkiewicz P, Mills CO, Roma MG, Ahmed-Choudhury J, Elias E, Coleman R. Tauroursodeoxycholate and S-adenosyl-L-methionine exert an additive ameliorating effect on tauroolithocholate-induced cholestasis: a study in isolated rat hepatocyte couplets. *Hepatology* 1999; 29: 471 – 476.
- 76 Misra S, Ujházy P, Gatmaitan Z, Varticovski L, Arias IM. The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J Biol Chem* 1998; 273: 26638 – 26644.
- 77 Misra S, Ujházy P, Varticovski L, Arias IM. Phosphoinositide 3-kinase lipid products regulate ATP-dependent transport by sister of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 in bile canalicular membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5814 – 5819.
- 78 Moriya S, Kazlauskas A, Akimoto K, Hirai SI, Mizuno K, Takenawa T, Fukui Y, Watanabe Y, Ozaki S, Ohno S. Platelet-derived growth factor activates protein kinase C ϵ through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C γ or phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 151 – 155.

- 79 Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1996; 382: 536 – 539.
- 80 Ohiwa T, Katagiri K, Hoshino M, Hayakawa T, Nakai T. Tauroursodeoxycholate and tauro- β -muricholate exert cytoprotection by reducing intrahepatocyte taurochenodeoxycholate content. *Hepatology* 1993; 17: 470 – 476.
- 81 Okada T, Sakuma L, Fukui Y, Hazeki O, Ui M. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 3563 – 3567.
- 82 Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999; 284: 1365 – 1368.
- 83 Patel T, Spivey J, Vadakekalam J, Gores GJ. Apoptosis – an alternative mechanism of bile salt hepatotoxicity. In: Paumgartner G, Beuers U (Hrsg.). *Bile acids in liver diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1995: 88 – 95.
- 84 Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 105 – 114.
- 85 Poupon R, Poupon RE, Calmus Y, Chretien Y, Ballet F, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for biliary cirrhosis? *Lancet* 1987; 1: 834 – 836.

- 86 Poupon RE, Balkau B, Eschwège E, Poupon R, UDCA-PBC study group. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 324: 1548 – 1554.
- 87 Poupon RE, Chretien Y, Poupon R, Paumgartner G. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid therapy. *Hepatology* 1993; 17: 599 – 604.
- 88 Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G, Vlahos CJ. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 1994; 54: 2419 – 2423.
- 89 Produktinformation zu Bisindolylmaleimid I-Hydrochlorid (Katalognummer 203291), Calbiochem-Novabiochem Corp. (Nottingham, Großbritannien).
- 90 Produktinformation zu Wortmannin (Produktnummer W1628), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA).
- 91 Reichen J, Simon FR. Cholestasis. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA (Hrsg.). *The liver. Biology and pathobiology*. 3. Auflage. Raven Press, New York, 1994: 1291 – 1326.
- 92 Roelofsen H, Schoemaker B, Bakker C, Ottenhoff R, Jansen PLM, Oude Elferink RPJ. Impaired hepatocanicular organic anion transport in endotoxemic rats. *Am J Physiol* 1995; 269: G427 – G434.
- 93 Roll J, Boyer JL, Barry D, Klatskin G. The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1983; 308: 1 – 7.
- 94 Roma MG, Penalva GL, Agüero RM, Rodriguez Garay EA. Hepatic transport of organic anions in tauro lithocholate-induced cholestasis in rats. *J Hepatol* 1994; 20: 603 – 610.

- 95 Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2000; 275: 20210 – 20216.
- 96 Sapin C, Baricault L, Trugnan G. PKC-dependent long-term effect of PMA on protein cell surface expression in Caco-2 cells. *Exp Cell Res* 1997; 231: 308 – 318.
- 97 Schliess F, Kurz AK, Dahl S vom, Häussinger D. Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 1997; 113: 1306 – 1314.
- 98 Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990; 12: 1216 – 1221.
- 99 Schölmerich J, Baumgartner U, Miyai K, Gerok W. Tauroursodeoxycholate prevents tauroolithocholate-induced cholestasis and toxicity in rat liver. *J Hepatol* 1990; 10: 280 – 283.
- 100 Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 1993; 260: 88 – 91.
- 101 Shapiro JM, Smith H, Schaffner F. Serum bilirubin: a prognostic factor in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1979; 20: 137 – 140.
- 102 Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems. *Methods Enzymol* 1978; 52: 48 – 59.
- 103 Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhoff R, van der Lugt NMT, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P. Homozygous disruption of the

- murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75: 451 – 462.
- 104 Soroka CJ, Pate MK, Boyer JL. Canalicular export pumps traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. *J Biol Chem* 1999; 274: 26416 – 26424.
- 105 Stellaard F, Sackmann M, Sauerbruch T, Paumgartner G. Simultaneous determination of cholic acid and chenodeoxycholic acid pool sizes and fractional turnover rates in human serum using ¹³C-labeled bile acids. *J Lipid Res* 1984; 25: 1313 – 1319.
- 106 Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell* 1994; 77: 83 – 93.
- 107 Stiehl A, Rudolph G, Sauer P, Theilmann L. Biliary secretion of bile acids and lipids in primary sclerosing cholangitis. Influence of cholestasis and effect of ursodeoxycholic acid treatment. *J Hepatol* 1995; 23: 283 – 289.
- 108 Stravitz RT, Rao YP, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Jarvis WD, Hylemon PB. Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Am J Physiol* 1996; 271: G293 – G303.
- 109 Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Hylemon PB. Signal transduction pathways regulating cholesterol 7 α -hydroxylase transcription by bile acids. In: Paumgartner G, Stiehl A, Keppler D, Gerok W, Leuschner U (Hrsg.). *Bile acids and cholestasis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1999: 39 – 50.
- 110 Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM, Cantley LC. Activation of protein kinase C family members by the

- novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *J Biol Chem* 1994; 269 (51): 32358 – 32367.
- 111 Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; 387: 673 – 676.
- 112 Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991; 266: 15771 – 15781.
- 113 Traynor-Kaplan AE, Harris AL, Thompson BL, Taylor P, Sklar LA. An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. *Nature* 1988; 334: 353 – 356.
- 114 Tsukahara K, Kanai S, Ohta M, Kitani K. Taurine conjugate of ursodeoxycholate plays a major role in the hepatoprotective effect against cholestasis induced by taurochenodeoxycholate in rats. *Liver* 1993; 13: 262 – 269.
- 115 Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999; 253: 239 – 254.
- 116 Van Nieuwkerk CMJ, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GNJ, Dingemans KP, van den Bergh Weerman MA, Offerhaus GJA. Effects of ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterology* 1996; 111:165 – 171.
- 117 Wahlländer A, Sies H. Glutathione S-conjugate formation from 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and biliary S-conjugate excretion in the perfused rat liver. *Eur J Biochem* 1979; 96: 441 – 446.

- 118 Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 1988; 332: 644 – 646.
- 119 Worthington Biochemical Corporation. Enzymes and related biochemicals. In: *Worthington Manual*. Worthington biochemical life sciences division. Freehold, N. J., 1987: 145 – 146.
- 120 Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 25846 – 25856.
- 121 Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; 267: 2003 – 2006.

7 Abkürzungsverzeichnis

A.E.	Arbiträre Einheit
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintri-phosphat
BIM-I	BisindolyImaleimid-I-Hydrochlorid
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	Rat bile salt export pump
CA	Cholsäure
$[Ca^{++}]_i$	Konzentration des intrazellulären Kalziums
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CDNB	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
DAG	Diazylglyzerol
DCA	Deoxycholsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxybis(ethylenitrilo)-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
Erk-1 und 2	Extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2
GS-DNP	2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion
GTP	Guanosintri-phosphat
HEPES	2,4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethansulfonsäure
Hep G2-Zelle	Hepatomzelle
HRP	Meerrettichperoxidase
IC ₅₀	Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung eines Enzyms erzielt wird.
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
K _i	Inhibitionskonstante
LCA	Lithocholsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP-Kinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase
Mdr2	Multidrug-resistance protein 2

MEM	Minimum essential medium
Mrp2	Rat multidrug-resistance protein 2
MW	Mittelwert
Ntcp	Na ⁺ /Taurocholat-cotransportierendes Polypeptid
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate-buffered solution
PDGF	Platelet derived growth factor
PI ₃ -Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TLCA	Taurolithocholsäure
TMS-Reagens	Trimethylsilylreagens
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure

8 Lebenslauf

Gerald Ulrich Denk

1973	Geboren am 12.04. in Aichach/Bayern als Sohn des Oberamtsrats a. D. Johann Denk und seiner Ehefrau, der Fachoberlehrerin Gertrud Denk-Markmiller, geb. Markmiller
1979-1983	Grundschule Aichach
1983-1992	Deutschherren-Gymnasium Aichach
08.07.1992	Allgemeine Hochschulreife
10/1992-3/1994	Studium der Biochemie, Universität Regensburg
4/1994-5/2000	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
10/1992-5/2000	Stipendiat der Konrad-Adenauer-Stiftung
26.05.2000	Teilapprobation als Arzt i. P.
7/2000-11/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik II am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München-Großhadern
Seit 12/2000	Arzt i. P. an der Medizinischen Klinik II am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München-Großhadern

9 Danksagungen

Die in der vorliegenden Dissertationsschrift beschriebenen Untersuchungen wurden in den Jahren 2000 und 2001 im Labor für hepatobiliäre Forschung, Prof. Dr. med. U. Beuers, der Medizinischen Klinik II am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München-Großhadern durchgeführt.

Ihr Gelingen verdanke ich der Unterstützung der Kolleginnen und Kollegen des Labors. Dabei möchte ich mich besonders bei Herrn R. Wimmer, CTA, für die professionelle und sehr engagierte Mithilfe bei den Perfusionsexperimenten und biochemischen Untersuchungen bedanken. Bei Frau G. Schwertfeger, CTA, bedanke ich mich für die äußerst tatkräftige Unterstützung bei der Gallensäureanalytik.

Herrn Dr. med. C. Rust danke ich für die methodische Hilfe bei der Durchführung des PI₃-Kinase-Assays.

Für die Unterstützung beim Erlernen der Operationstechnik bedanke ich mich bei Herrn F. Schmitt. Herrn S. Hohenester danke ich für die Mithilfe bei der Vorbereitung der Experimente.

Bei Herrn Prof. Dr. med. G. Paumgartner möchte ich mich ganz herzlich für seine Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse bedanken, die dem weiteren Verständnis der Problematik sehr dienlich war.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. U. Beuers, der mein Interesse für die Hepatologie angeregt hat. Ich möchte mich bei ihm für die Überlassung des Themas, die wohlwollende Förderung und die ganz außergewöhnliche und vorbildliche Betreuung bedanken. Hervorheben möchte ich seine ständige Bereitschaft zur Hilfe bei methodischen Problemen und zur Diskussion.