

**Regulation des renalen Natrium-abhängigen Gallensäuren Transporters (ASBT)
durch Sexualhormone und Glukokortikoide**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Frank Biggemann

aus

Mönchengladbach

Berichter:

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Joachim Greven

Herr Professor
Dr. med. Bernhard Heintz

Tag der mündlichen Prüfung: 28. August 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

**Meinen Eltern, Opi und Omi
gewidmet.**

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	11
1.1	Zielsetzung der Arbeit	11
1.2	Physiologie des Gallensäuretransportes	12
1.3	„Genetik“ der Natrium-abhängigen Gallensäuren Transporter	14
1.4	Funktionelle Eigenschaften der Natrium-abhängigen Gallensäuren Transporter	15
1.5	Der SLC10A2-Transporter (ASBT)	16
1.6	Der ASBT als „pharmakologisches Target“	17
1.7	Die Bedeutung des ASBT bei Krankheiten des Menschen	18
1.8	Die Regulation der ASBT-Expression	19
1.9	Die Bedeutung des ASBT in der Niere	20
1.10	Anatomie der Nieren	21
1.10.1	Allgemeines	21
1.10.2	Makroskopische Gliederung der Niere	22
1.10.3	Nephron und Sammelrohr	23
1.10.4	Mikroskopische Anatomie des proximalen Tubulus	24
1.10.5	Gefäßversorgung der Niere	24
1.11	Physiologie der Nieren	25
1.11.1	Allgemeines	25
1.11.2	Glomeruläre Filtration	25
1.11.3	Clearance	26
1.11.4	Flüssigkeitsausscheidung	26
1.11.5	Elektrolyttransport	26
1.11.6	Säure-Basen-Haushalt	27
1.11.7	Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen	27

1.11.8	Weitere Aufgaben der Nieren	27
1.12	Bemerkungen zu den verwendeten Substanzen	28
1.12.1	Allgemeine Wirkungsweise von Steroidhormonen	28
1.12.2	Dexamethason: ein hochpotentes synthetisches Glukokortikoid	29
1.12.3	Testosteron-Propionat: ein männliches Sexualhormon mit langer Halbwertszeit	29
1.12.4	Ethinyl-Estradiol: ein weibliches Sexualhormon mit langer Halbwertszeit	30
1.12.5	Buserelin: ein Gonadoliberin-Analogon	31
1.12.6	ICI 182780 (Faslodex): ein potentes Antiestrogen	32
2.	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Vorbemerkungen zu den Versuchstieren	33
2.2	Frische Isolierung der proximalen Tubuluszellen	33
2.2.1	Versuchsaufbau	33
2.2.2	Vorbereitungen vor Versuchsbeginn	33
2.2.3	Präparation der Tiere	34
2.2.4	Perfusion der Nieren	36
2.2.5	Zentrifugation der aufgereinigten Zellsuspension	37
2.2.5.1	Vorbemerkungen	37
2.2.5.2	Durchführung	37
2.2.6	Quantifizierung der proximalen Tubuluszellen	38
2.2.7	In vitro-Aufnahmestudien	39
2.3	Clearance-Experimente	40
2.3.1	Vorbemerkungen	40
2.3.2	Durchführung	40
2.4	Western Blot-Experimente	41

2.4.1	Vorbemerkungen	41
2.4.2	Vorbereitung der Proben	41
2.4.3	Auftrennung des Proteingemisches	42
2.4.4	Membrantransfer	42
2.4.5	Proteindetektion	42
2.5	Chirurgische Ovariectomie und chirurgische Adrenalectomie	43
2.5.1	Vorbemerkungen	43
2.5.2	Durchführung der Ovariectomie	44
2.5.3	Durchführung der Adrenalectomie	44
2.6	Implantation osmotischer ALZET®-Minipumpen	45
2.6.1	Vorbemerkungen	45
2.6.2	Funktionsweise	45
2.6.3	Subkutane Implantation der mit Buserelin befüllten Minipumpen	45
2.7	Bestimmung der Gallensäuren im Serum	46
2.7.1	Konzentration der Reaktionslösungen	47
2.7.2	Durchführung	47
2.7.3	Auswertung	48
2.8	Verwendete Substanzen	48
2.8.1	Radioaktiv markierte Substanzen	48
2.8.2	Unmarkierte Substanzen	48
2.8.3	Zusammensetzung der Lösungen	48
2.8.4	Material Western Blot	49
2.9	Statistik	51
2.9.1	Vorbemerkungen	51

2.9.2	Varianzanalyse	52
2.9.3	Unverbundener Student`s t-Test	52
3.	ERGEBNISSE	53
3.1	Vorbemerkungen	53
3.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede im renal tubulären Taurocholattransport	53
3.2.1	Transportstudie an unbehandelten männlichen bzw. weiblichen Ratten	53
3.2.2	Einfluss von Testosteron auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten	55
3.2.3	Einfluss von Estradiol auf den renalen Taurocholattransport männlicher Ratten	57
3.2.4	Einfluss des Antiestrogens ICI 182780 (Faslodex) auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten	59
3.2.5	Einfluss des GnRH-Analogons Buserelin auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten	61
3.2.6	Einfluss von chirurgischer Ovariectomie auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten	62
3.2.7	Einfluss von Ovariectomie und nachfolgender Estrogen-Behandlung auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten	64
3.2.8	Bestimmung von Estradiol im Serum vorbehandelter männlicher Ratten	66
3.2.9	Clearance-Experimente	67
3.2.9.1	Vorbemerkungen	67
3.2.9.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Taurocholatlclearance	67
3.2.10	Bestimmung der Gallensäuren	68
3.2.11	Western Blot-Experimente	70
3.3	Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf den renal tubulären Taurocholattransport	71
3.3.1	Vorbemerkungen	71
3.3.2	Aufnahmestudien an frisch isolierten proximalen Tubuluszellen	71
3.3.3	Clearance-Experimente	74

3.3.4	Western Blot-Experimente	75
4.	DISKUSSION	78
4.1	Geschlechtsspezifische Unterschiede im renal tubulären Taurocholattransport	78
4.2	Effekt des Androgens Testosteron-Propionat auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten	79
4.3	Effekt des Estrogens Ethinyl-Estradiol auf den renal tubulären Taurocholattransport männlicher Ratten	79
4.4	Effekt des Antiestrogens ICI 182780 (Faslodex) auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten	80
4.5	Effekt des GnRH-Analogons Buserelin auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten	80
4.6	Effekt einer chirurgischen Ovariectomie auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten	81
4.7	Fazit der geschlechtsspezifischen Regulation des renal tubulären Taurocholattransportes	81
4.8	Effekt des Glukokortikoids Dexamethason auf den renal tubulären Taurocholattransport	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	85
6.	LITERATURVERZEICHNIS	87
7.	DANKSAGUNG	98
8.	LEBENS LAUF	99

1. EINLEITUNG

1.1 Zielsetzung der Arbeit

In früheren Studien wurde gezeigt, dass das renal exprimierte Natrium-abhängige Gallensäuren-Transportsystem sowohl einer Langzeit- während einer obstruktiven Cholestase- (69, 110) als auch einer Kurzzeit-Regulation - durch den Second Messenger cAMP und MAP-Kinasen- (107) unterliegt. Der Zweck der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob der tubuläre Taurocholattransport durch Steroidhormone (Sexualhormone und Glukokortikoide) reguliert wird.

In der Literatur sind bisher viele Befunde zur Thematik der geschlechtsspezifischen Regulation zu finden, die physiologische bzw. pharmakologische Bedeutung haben (Review: 41). Geschlechtsspezifische Unterschiede im Transport von endogenen Substraten und Xenobiotika über Zellmembranen wurden in verschiedenen Organen des Organismus einschließlich Niere, Leber, Intestinum und Gehirn beschrieben (Review: 82). Bezüglich der Niere wurden geschlechtsspezifische Unterschiede beim tubulären Transport organischer Anionen sowie Kationen nachgewiesen. So war die Clearance von Paraaminohippurat (PAH) bei weiblichen Ratten niedriger als bei männlichen Tieren (23). Desweiteren wurde eine Regulation des renalen Organischen Anionentransporters (OATP) der Ratte durch Sexualhormone beobachtet (20). Ljubojevic et al. wiesen darüber hinaus nach, dass die Expression der OAT 1 und 3, welche zu den wichtigsten renalen Transportern für PAH gehören, bei weiblichen Ratten geringer war (73). Für den organischen Kationen-Transporter (OCT2) wurden ebenfalls ähnliche geschlechtsspezifische Unterschiede nachgewiesen (130, 131, 132). Auch andere Transportproteine der Niere zeigten geschlechtsspezifische Unterschiede: der Amilorid-sensitive epitheliale Natrium-Kanal (ENaC, 39), die α_1 -Untereinheit der Na^+ - K^+ -ATPase (37) und der Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporter (15). Außerdem wurde schon früher von Anton et al. ein geschlechtsspezifischer Unterschied im renalen Transport von Urat beschrieben (4). In Untersuchungen zum Gallensäuren-Transport konnte eine geringere hepatische Taurocholatriefaufnahme für weibliche gegenüber männlichen Ratten gezeigt werden (17, 118). Es wurde nun kürzlich nachgewiesen, dass Estrogene für diesen geschlechtsspezifischen Unterschied verantwortlich sind. Die hepatische Gallensäuren-Aufnahme wird größtenteils durch den NTCP, der – wie der ASBT – Mitglied der Natriumgekoppelten Gallensäuren-Transporter-Familie (SLC 10) ist, vermittelt. Diese beiden Trans-

porter weisen zu 35 % eine Identität in der Aminosäuresequenz auf (Review: 129). Da es zur Zeit keine Untersuchungen bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede im renal tubulären Taurocholattransport gibt, widmet sich die vorliegende Arbeit dieser Aufgabe.

Außerdem wurde der Einfluss von Glukokortikoiden auf den renal tubulären Taurocholattransport untersucht, da Nowicki et al. an Ratten eine eindrucksvolle Heraufregulation des Natrium-abhängigen Gallensäuren Transportsystems im Ileum nachgewiesen hatten (86). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch das humane Natrium-abhängige Gallensäuren Transportsystem in-vivo und in-vitro durch Glukokortikoide induziert wird (60). Diese Befunde legen eine Untersuchung der Regulation des Gallensäuretransportes in der Niere durch diese Hormone nahe.

1.2 Physiologie des Gallensäuretransportes

Gallensäuren sind amphipathische steroidale Moleküle. Die beim Menschen dominierenden Gallensäuren sind die dihydroxilierte (3α -, 7α -OH) Chenodesoxycholsäure und die trihydroxilierte (3α -, 7α -, 12α -OH) Cholsäure. Sie werden ausschließlich in der Leber enzymatisch aus Cholesterol synthetisiert (101, 126). Diese sogenannten primären Gallensäuren werden dann nach intrazellulärer Synthese in den Hepatozyten an ihrer terminalen Carboxyl-Gruppe (C_{24}) mit den Aminosäuren Taurin oder Glycin konjugiert (36). Dadurch bekommen die Gallensäuren einen stärker hydrophilen Charakter. Glycokonjugate kommen vorwiegend beim Menschen vor. Bei Nagern überwiegen dagegen die Taurokonjugate. Aufgrund der niedrigen pK_a -Werte liegen die Gallensäuren bei physiologischen pH-Werten vor allem in der anionischen Form vor (56). Deshalb haben sie auch die Bezeichnung „Gallensalze“ bekommen. Aufgrund dieser niedrigen pK_a -Werte bleiben die konjugierten Gallensäuren vorwiegend im Lumen des Darms und benötigen ein Transportprotein zur Reabsorption. Unkonjugierte Gallensäuren mit pK_a -Werten von größer fünf werden dagegen effizient durch passive Diffusion resorbiert (6). Galle besteht zu etwa zwei Dritteln aus Gallensäuren. Weitere Bestandteile sind Phospholipide, Cholesterol und Proteine. Die zum Plasma isoosmotische Galle wird in der Gallenblase gespeichert und eingedickt. Die Eigenschaft der Gallensäuren als Detergenzien hilft Phospholipide und Cholesterol in Form von gemischten Mizellen in Lösung zu halten. Nach der Nahrungsaufnahme werden die Gallensäuren in den Zwölffingerdarm sezerniert und tragen im Dünndarm zur effizienten Verdauung und Resorption von Nahrungsfett und den fettlöslichen Vitaminen A, D, E und K bei. Weiterhin regulieren die intraduodenalen Gallen-

säuren die Sekretion der Bauchspeicheldrüse und die Freisetzung gastrointestinaler Peptide

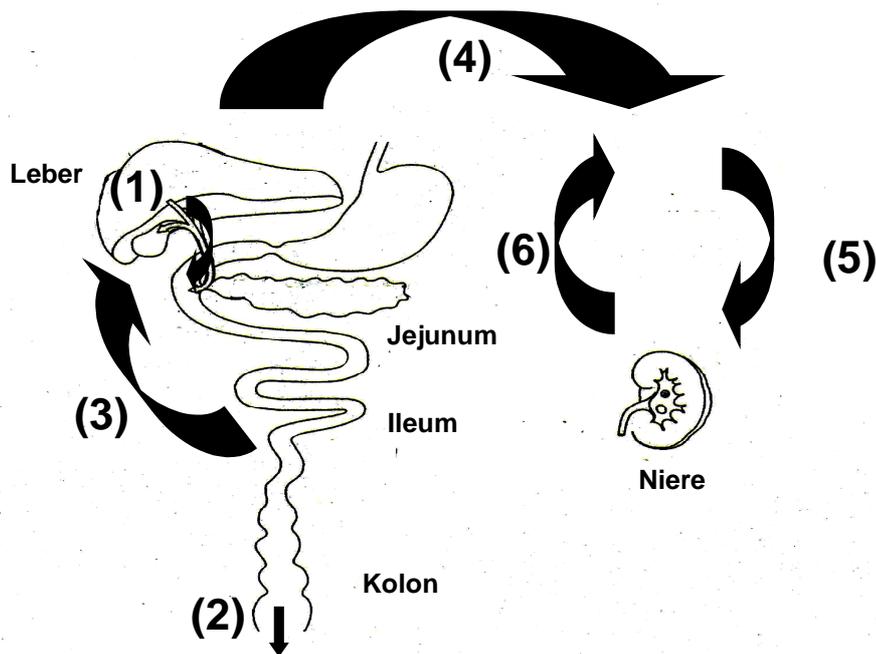


Abb. 1 : Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren (1+3). Die dem „first-pass“-Mechanismus der Leber entgehenden Gallensäuren gelangen in den systemischen Kreislauf (4) und werden im proximalen Tubulus nach glomerulärer Filtration (5) zurückresorbiert (6). Fäkale Ausscheidung (2).

(97, 62). Außerdem spielt die Galle eine große Rolle in der Cholesterinhomöostase und bei der hepatischen Elimination von lipophilen Xenobiotika, Medikamenten und Schwermetallen. Nur ein kleiner Teil der Gallensäuren (0,2-0,6 g) wird mit dem Stuhl ausgeschieden. Dieser Verlust von weniger als 5 % wird wiederum durch eine Gallensäurensynthese der Leber ausgeglichen, wobei auf diesem Weg Cholesterin eliminiert wird. Ein kleiner Teil der Gallensäuren wird im proximalen Dünndarm entweder passiv oder Carrier-vermittelt (Natrium-unabhängig) resorbiert (3, 135). Der größte Anteil der Gallensäuren wird jedoch im distalen Ileum reabsorbiert (101, 115, 145). So gelangen mehr als 95 % der Gallensäuren in die Pfortader und werden so für den Organismus konserviert (147). Schließlich erreichen sie wieder die Leber. Dort werden die Gallensäuren wieder in die Galle reseziert, so dass nur ein geringer Bedarf an hepatischer „De-Novo-Synthese“, die der Menge der fäkal verlorenen Gallensäuren entspricht, besteht. Nun werden die Gallensäuren bei Bedarf wieder in den Dünndarm abgegeben, so dass ein sogenannter „Enterohepatischer Kreislauf“ der Gallensäuren vorliegt (22). Dieser wird von den Gallensäuren etwa vier bis zwölf mal pro Tag durchlaufen. Somit ist der enterohepatische Kreislauf ein effektives in-vivo System zur Konservierung der Gallensäuren (121), so dass diese dem Organismus immer wieder zur Verfügung stehen.

Zur Funktion dieses enterohepatischen Kreislaufs tragen verschiedene Transportproteine der Natrium-gekoppelten Gallensäuren-Kotransporter-Familie (SLC 10) bei: Das „Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide“ (NTCP, SLC10A1) wird in der sinusoidalen Plasmamembran der Hepatozyten exprimiert und transportiert Gallensäuren aus dem Portalvenenblut für die erneute Sekretion in die Galle. Der zweite wichtige Transporter ist der „Apical Sodium-dependent Bile Salt Transporter“ (ASBT, SLC10A2), der vor allem im Bürstensaum der ilealen Enterozyten und im proximalen Tubulus der Niere exprimiert wird. Dieses konnte durch Western Blot- und indirekte Immunfluoreszenz-Experimente gezeigt werden (25). Durch einen sekundär aktiven Transportmechanismus werden so Gallensäuren aus dem Darm resorbiert um in die Pfortader zu gelangen bzw. aus dem Harnkanälchen um der Ausscheidung mit dem Urin zu entgehen. Außerdem wurde ein weiteres Protein, das sogenannte „Ileal Lipid Binding Protein“ (ILBP), im Zytosol der Enterozyten identifiziert, welches möglicherweise eine Rolle beim intrazellulären Transport der Gallensäuren spielen könnte (102). Die physiologische Relevanz dieses Proteins für den Transport der Gallensäuren ist derzeit aber noch nicht klar, da es in der Niere und den Gallengängen nicht exprimiert wird. Desweiteren ist noch ein weiteres Transportprotein, der OATP 3 („Organic Anion Transporting Polypeptide“), erwähnenswert, der im proximalen Dünndarm (Jejunum) zur Natrium-unabhängigen Gallensäuren-Resorption beiträgt (135).

1.3 „Genetik“ der Natrium-abhängigen Gallensäuren Transporter

Der NTCP der Ratte wurde erstmals mittels Expressions-Klonierung in *Xenopus laevis* Oozyten isoliert (47). Mit der cDNA wurde dann das humane Ortholog 1994 von Hagenbuch und Meier gefunden (45). Auch der ASBT wurde mit Hilfe Expressions-Klonierung aus einer cDNA-Bibliothek des Ileums vom Hamster isoliert (145). Darauf folgte die Identifikation der ASBT-Orthologe der Ratte (115), des Menschen (89), des Kaninchen (64) und schließlich der Maus (103). Wong et al. fanden 1996 heraus, dass das SLC10A2-Gen auf dem großen Arm von Chromosom 13 liegt (13q33) (147). Das SLC10A1-Gen ist dagegen auf Chromosom 14 lokalisiert worden und kann somit klar vom ilealen Natrium-gekoppelten Gallensäuren-Kotransporter-Gen unterschieden werden. Lammert et al. zeigten (66), dass der Locus des *Slc10a2*-Gens der Maus auf dem Chromosom 8 liegt, einer Region, die dem Chromosom 13 homolog ist.

1.4 Funktionelle Eigenschaften der Natrium-abhängigen Gallensäuren Transporter

Beide Natrium-gekoppelten Gallensäuren-Kotransporter transportieren konjugierte und unkonjugierte Gallensäuren. Die einzige Ausnahme für den NTCP ist Estron-3-Sulfat, welches auch als „Nicht-Gallensäure“ transportiert wird (111). Die Triebkraft wird sowohl für den ASBT als auch den NTCP durch einen einwärts gerichteten Natriumgradienten geliefert, welcher durch die Aktivität der basolateral lokalisierten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufrechterhalten wird und so für das negative intrazelluläre Potential sorgt. Die Abhängigkeit der Gallensäureaufnahme in ileale Enterozyten von einem Natrium getriebenen elektrochemischen Potentialgradienten konnte schon im Jahre 1981 von Wilson et al. gezeigt werden (142). Somit liegt hier ein sekundär aktiver Transportprozess vor. Außerdem wurde bekannt, dass der Transport mit einer Stöchiometrie von Natrium zu Gallensäure von 2:1 elektrogen ist (46, 138). Dieses unterstützen auch von Lücke et al. durchgeführte Studien an ilealen Bürstensaummembran-Vesikeln (75). Bezüglich der Topologie schlagen Computerprogramme für beide Transporter eine Struktur mit sieben Transmembrandomänen vor (45, 146). Dagegen lassen experimentelle Befunde von Hallen et al. auf eine Anordnung mit neun Transmembrandomänen schließen (48, 49). Eine Arbeit aus dem Jahre 2004 favorisiert wiederum eher eine Membran-Topologie mit sieben Domänen (149). Im folgenden wird nach dieser allgemeinen Einleitung zum Gallensäuretransport vornehmlich auf den ASBT eingegangen, da dieser Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.5 Der SLC10A2-Transporter (ASBT)

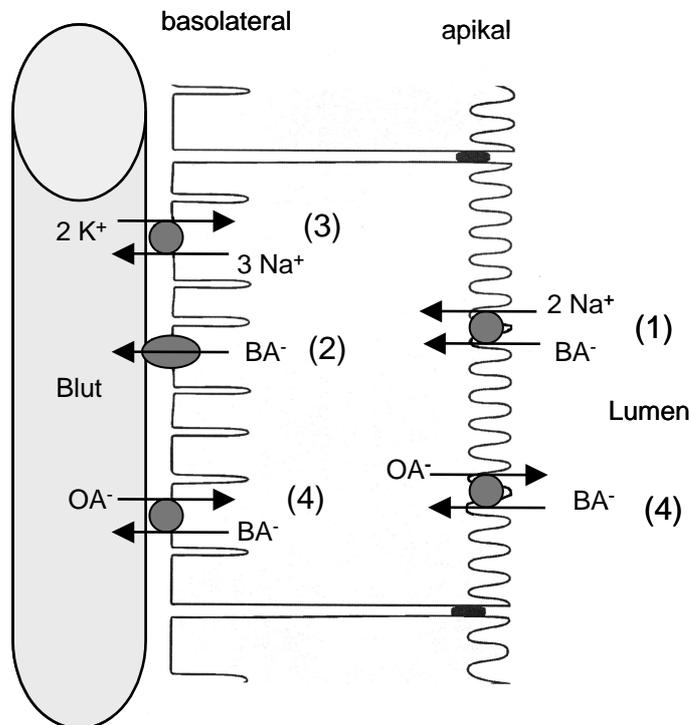


Abb. 2 : *Transportmechanismen der proximalen Tubuluszelle für Gallensäuren (BA^-):* Die in den Glomeruli der Nieren filtrierte Gallensäuren werden im proximalen Tubulus nahezu vollständig durch den in der apikalen Bürstensaummembran lokalisierten Natrium-abhängigen Gallensäuren Transporter (ASBT) (1) reabsorbiert. Die Triebkraft wird durch einen einwärts gerichteten Natriumgradienten geliefert, der durch die Aktivität der basolateral lokalisierten Na^+K^+ -ATPase (3) aufrechterhalten wird. Den basolateralen Efflux der Gallensäuren gewährleistet eine trunkierte, durch alternatives Spleißen entstandene Variante des ASBT (tASBT) (2). Außerdem tragen in geringer Weise Organische Anionentransporter (OATP) (4) im Austausch mit organischen Anionen (OA^-) zum Gallensäuretransport über die apikale und basolaterale Zellmembran im proximalen Tubulus bei.

Der humane ASBT ist ein Glykoprotein, das aus 348 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa hat (146). Durch ausgiebige Charakterisierung der Substratspezifität des ASBT des Hasen entwickelten Baringhaus et al. ein dreidimensionales Modell einer „Pharmakophore“ für den ASBT (7). Dabei zeigte sich, dass verschiedene funktionelle chemische Gruppen (Methyl-, Hydroxylgruppen) an bestimmten Positionen des Moleküls essentiell für die Bindungseigenschaften und die Flexibilität des Transportproteins sind. Als Substrat des ASBT dienen alle Arten von Gallensäuren, wobei Cholsäure (dreifach hydroxiliert) gegenüber dihydroxilierten Gallensäuren bevorzugt wird. Desweiteren erhöht die Konjugation einer Gallensäure die Affinität zum Transporter. Der ASBT wird in hoher Zahl

im distalen Ileum (27, 123), in geringerer Ausprägung im proximalen Tubulus der Niere (29) und in den Gallengängen (2, 67) exprimiert. Im terminalen Ileum und der Niere dient er der Konservierung der Gallensäuren, um unnötige Verluste für den Organismus zu vermeiden. In den Gallengängen ist dagegen die Transportaktivität eher sekundär. Hier werden wahrscheinlich intrazelluläre Signalwege aktiviert (67). Studien mittels indirekter Immunfluoreszenz zeigten, dass der ASBT in der Niere in der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen (siehe Abb. 2) lokalisiert ist (25). Diese Befunde decken sich mit früheren Transportstudien an isolierten, perfundierten Tubuli (141). Schlattjan et al. konnten diese Befunde ebenfalls bestätigen (107). Die Aminosäuren des ASBT-Proteins sind zu etwa 35 % mit denen des NTCIP identisch. Orthologe des ASBT wurden in der Ratte, der Maus, dem Hamster und dem Kaninchen gefunden (s.o.). Darüber hinaus ist bei der Ratte eine trunkierte Variante des ASBT bekannt, welche durch alternatives Spleißen der mRNA entsteht (tASBT = truncated ASBT). Der tASBT hat ein Molekulargewicht von 19 kDa und besteht aus der Hälfte der Aminosäuren des ASBT (348 vs. 154 Aminosäuren). Es konnte gezeigt werden, dass der tASBT in der basolateralen Membran von Enterozyten, proximalen Tubuluszellen, Cholangiozyten lokalisiert ist und als Gallensäuren-Efflux-Pumpe fungiert (68). Außerdem wurde berichtet, dass die Expressionsraten des tASBT im Ileum doppelt so hoch sind wie für den ASBT. Nebenbei sei noch erwähnt, dass dies das erste Beispiel eines SLC-Gens (Solute carrier-Gen) ist, welches sowohl den Aufnahme- als auch den Efflux-Mechanismus kodiert.

1.6 Der ASBT als „pharmakologisches Target“

Eine Hemmung der Gallensäuren-Resorption kann effektiv mit Gallensäuren-bindenden Harzen (z.B. Cholestyramin) durchgeführt werden. Dadurch wird der hepatische Cholesterolbedarf gesteigert, somit konsekutiv die Zahl der LDL-Rezeptoren erhöht und schließlich das Plasma-LDL-Cholesterin gesenkt. Eine direkte Hemmung der Gallensäuren-Resorption kann durch spezifische Inhibitoren des ASBT, der eine dominante Rolle im enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren spielt, geschehen. Somit ist er ein potentiellles Angriffsziel der Cholesterin-senkenden Therapie. Diese Inhibitoren mit hoher Affinität zum ASBT können in zwei Klassen eingeteilt werden: erstens Gallensäuren-Derivate einschließlich Gallensäuren-Dimere (139) und Nicht-Gallensäuren-Derivate, Benzothiazepin- (98) und Benzothiepin-Analoga (128). Zwei Inhibitoren in der Phase 2 der klinischen Prüfung reduzierten das LDL-Cholesterin um 10 % (122). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das dimerische Gal-

lensäuren-Analogon S 0960, ebenfalls ein potenter spezifischer Hemmstoff des ilealen ASBT, auch in der Niere seine inhibierende Wirkung auf den ASBT entfaltet (109). Folglich könnten derartige Hemmstoffe für Patienten mit extrahepatischer Cholestase und konsekutiv erhöhten Plasmaspiegeln an Gallensäuren einen großen klinisch-therapeutischen Wert erlangen, um die renale Gallensäuren-Exkretion zu erhöhen.

1.7 Bedeutung des ASBT bei Krankheiten des Menschen

Der ASBT nimmt eine Schlüsselposition in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen ein und hat konsekutiv auch einen großen Einfluß auf verschiedene Krankheiten beim Menschen. Dieses wird besonders bei Patienten, die an primärer Gallensäuren-Malabsorption (PBAM) leiden, deutlich. Sie zeigen eine kongenitale Diarrhoe und Steatorrhoe einhergehend mit einer Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs und verminderten Cholesterolspiegel im Plasma. Bei ihnen liegen Mutationen des ASBT-Gens vor die zu einem nicht funktionierenden Transportprotein führen können (90). Es kommt somit zu Gedeihstörungen der Kinder. Durch die massive Gallensäuren-Malabsorption ist bei ihnen der „Gallensäuren-Pool“ im Organismus reduziert. Eine sekundäre Dysfunktion des ASBT einhergehend mit Gallensäuren-Malabsorption und Diarrhoe läßt sich nach chirurgischer Resektion des Ileums bei Kleinkindern (54), bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom (91), bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (60, 87), bei radiogener Enteritis (26), bei HIV-Enteropathie (113, 124) sowie bei Kindern mit Mukoviszidose (88, 136) beobachten. Desweiteren gibt es bei Menschen mit Hypertriglyceridämie Typ IV Hinweise auf eine verminderte Absorption von Gallensäuren aufgrund reduzierter Expression des ASBT (32, 33). Therapeutisch kann eine Malabsorption der Gallensäuren bei Hypercholesterinämie und intrahepatischer Cholestase genutzt werden. Diese kann einerseits durch eine chirurgische Bypass-Operation (18) und andererseits durch pharmakologische Substanzen, die die Funktion des ASBT inhibieren (50, 59, 99, 139) hervorgerufen werden. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass diese Inhibitoren den Gallensäuren-Verlust mit dem Stuhl effektiv erhöhen und so erhöhte Cholesterolspiegel im Serum gesenkt werden konnten (55, 58, 70). Während obstruktiven Erkrankungen der Leber steigt die Exkretion der Gallensäuren im Urin massiv an (92). Lee et al. zeigten eine adaptive Herunterregulation des ASBT in der Niere zwei Wochen nach Ligatur des Gallenganges bei Ratten (69). Dieses Phänomen konnte auch in der frühen Phase einer Cholestase bestätigt werden (110).

1.8 Regulation der ASBT-Expression

Die Regulation der Expression des ASBT findet auf vielfältige Weise statt. Zunächst besteht eine gewisse Gewebsspezifität der Expression, die das Ileum, die Niere, die Gallengänge und die Gallenblase einschließt. Darüber hinaus besteht in diesen Organen eine Regions- bzw. Zell-Spezifität, d.h. der ASBT ist nur auf villösen Enterozyten im terminalen Ileum, nur auf proximalen Tubuluszellen und nur auf großen Cholangiozyten zu finden. Es ist hierbei noch interessant zu erwähnen, dass eine Resektion des terminalen Ileums nicht die ASBT-Expression in proximaleren Teilen des Dünndarms induziert, so dass die Expression tatsächlich nur auf den Endteil des Ileums beschränkt zu sein scheint (27). Die transkriptionelle Regulation der ASBT-Gen-Expression wird durch HNF1 α (Hepatic Nuclear Factor 1 α) kontrolliert, da bei „Knock-out“ Mäusen, bei denen kein HNF1 α vorhanden ist, auch kein ASBT exprimiert wird (114). Dagegen scheint die Abhängigkeit von anderen nukleären Rezeptoren wie FXR/BAR (Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor) wie beim NTCP nicht gegeben zu sein (120). Darüber hinaus konnte an verschiedenen Tiermodellen mittels physiologischer und molekularer Studien gezeigt werden, dass eine ontogenetische Abhängigkeit des intestinalen Gallensäuretransportes besteht. Während der Entwicklung der Ratte wird der ASBT biphasisch exprimiert. Zuerst wird er am 22. Tag der Gestation gefunden. Darauf folgt ein vorübergehender Abfall der ASBT-Expression und schließlich ein steiler Anstieg der Expression am 17. und 18. Tag nach der Geburt (115, 117). Die Mechanismen der entwicklungsabhängigen ASBT-Expression sind noch nicht bekannt, wobei Transkription und mRNA-Stabilität eine Rolle spielen könnten. Vor der Entwöhnung vermögen Kortikosteroide, Schilddrüsenhormone und Gabe von Gallensäuren den Gallensäuren-Transport im Dünndarm zu erhöhen (8, 53, 116). Dabei ist es durchaus interessant, dass dasselbe Genprodukt in der Niere während der Ontogenese unverändert bleibt (25). Kontrovers wird dagegen die Regulation des ASBT-Gens durch Gallensäuren selbst diskutiert. Veränderungen des Gallensäuren-Pools könnten einen Einfluß auf die intestinale ASBT-Expression haben, wobei sowohl die Gabe von Gallensäuren selbst als auch die Gabe von Gallensäuren-bindenden Harzen zu einer Erhöhung der ASBT-Expression im Darm führten (19, 127). Bei Ratten hingegen zeigte sich nach Ligatur des Ductus choledochus eine Herunterregulation des ASBT im Ileum (105). Auch eine indirekte Erhöhung des Gallensäuren-Pools durch vermehrte Aufnahme von Cholesterol mit der Nahrung führte zu widersprüchlichen Befunden. Beim Hasen wurde dadurch die ASBT-Expression stimuliert,

nicht hingegen bei der Ratte (148). Diese Diskrepanzen liegen womöglich in unterschiedlichen experimentellen Zugängen. Darüber hinaus könnte eine Spezies-Spezifität der Effekte die Unterschiede erklären. Weiterhin besteht eine Abhängigkeit der Expression von Entzündungsprozessen, was bei der Ileitis bei Morbus Crohn mit Gallensäuren-Malabsorption klar gezeigt werden konnte (80). In einem Ileitis-Tiermodell beim Kaninchen konnte auch eine Herunterregulation durch die Entzündung bestätigt werden (144). Im Ileum der Ratte und des Kaninchens zeigte sich in einem entzündungsfreien Stadium eine Heraufregulation des ASBT durch Gabe von Glukokortikoiden (86, 144). Die bisherigen experimentellen Befunde bezüglich transkriptioneller und posttranskriptioneller Regulation unterstreichen also die physiologische Bedeutung der Gallensäuren-Resorption durch den ASBT für den enterohepatischen Kreislauf und die Lipidhomöostase des Organismus.

1.9 Die Bedeutung des ASBT in der Niere

Zwischen 10-50 % der im terminalen Ileum reabsorbierten Gallensäuren entgehen dem enterohepatischen Kreislauf und gelangen in die periphere Zirkulation (56). Die Daten der Reabsorptionsraten schwanken, da der Prozess Gallensäuren-Spezies abhängig ist. Ungefähr ein fünftel der im Blutplasma vorhandenen Gallensäuren sind nicht an Proteine (Albumin) gebunden und werden somit glomerulär filtriert (100). Jedoch liegt die Ausscheidung von Gallensäuren im Urin weit unter der glomerulär gefilterten Menge an Gallensäuren aufgrund nahezu vollständiger tubulärer Reabsorption (9, 137). Folglich haben die Nieren auch eine große Bedeutung für den Organismus bei der Konservierung von Gallensäuren. Diese Reabsorption findet im proximalen Tubulus der Niere statt. Dort in der apikalen Bürstensaummembran der Zellen ist ein Natrium-gekoppeltes Gallensäuren-Kotransportsystem, der sogenannte ASBT (Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter) lokalisiert (21, 141). Dieser Transporter ist mit dem ilealen ASBT identisch und beide werden durch dasselbe Transkript des gleichen Gens kodiert (25, 29). Die Rolle der renal tubulären Reabsorption von Gallensäuren wurde schon 1977 von Barnes et al. erforscht (9). Wie effektiv diese Reabsorption ist wird deutlich, wenn man sich klar macht, dass pro Tag eine Gesamtmenge von 100 μmol an Gallensäuren in der gesunden Niere filtriert wird ($\text{GFR} = 156$ l/Tag). Die Gesamtkonzentration an Gallensäuren im Plasma liegt physiologischerweise bei etwa 5-10 $\mu\text{mol/l}$ (112). Davon liegen etwa 5-20 % Protein-ungebunden vor, d.h. normalerweise eine Menge von ungefähr 0,5-1 $\mu\text{mol} / \text{l}$ (28). Unter diesen Voraussetzungen erscheinen täglich aber nur minimale 1-2 μmol im Urin (5, 125). Dieses Rechenbeispiel zeigt

welche Arbeit das Gallensäuren-Kotransportprotein im proximalen Tubulus leistet. Unter den pathologischen Bedingungen einer Cholestase steigen die Plasmakonzentrationen der Gallensäuren auf bis zu 200 $\mu\text{mol/l}$, so dass 2000-4000 μmol pro Tag glomerulär filtriert werden. Trotzdem werden hier wieder nur 40-80 μmol pro Tag im Urin ausgeschieden. So kann der Grad der Reabsorption in den proximalen Tubuli der Niere durchaus mit dem des Dünndarms verglichen werden. Dies zeigten auch experimentelle Befunde an Plasmamembranen, die aus Nierenhomogenisaten isoliert wurden (1). Wenn man das „Leistungsvermögen“ des ASBT betrachtet, konnte unter anderem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass er Gallensäuren bis auf den Faktor fünf bis sechs gegenüber dem Lumen des proximalen Tubulus gegen einen elektrochemischen Gradienten intrazellulär akkumuliert. Dieser Akkumulationsfaktor ist vergleichbar mit dem des PAH-Transporters (Paraaminohippurat-Transporter), der stark im proximalen Tubulus der Niere exprimiert wird (83). Daraus kann man indirekt schließen, dass der ASBT ähnlich massiv an diesem Ort vorhanden ist.

1.10 Anatomie der Nieren

1.10.1 Allgemeines

Die Nieren sind paarig im Retroperitoneum angelegt. Ihre Form gleicht einer Bohne. Die laterale Seite ist konvex und die mediale ist zum Hilum renale eingezogen, welches sich weiter in den Sinus renalis fortsetzt. Diese tiefe Ausbuchtung beinhaltet das Nierenbecken, Pelvis renalis, die dazugehörigen Nierenkelche, Calices renalis, und den versorgenden Gefäß-Nerven-Strang (Arteria und Vena renalis, Lymphgefäße, Plexus renalis). Der Zwischenraum des Sinus renalis wird von Fettgewebe ausgefüllt. Das Nierenbecken geht dann in den Ureter über. Die gesamte Niere wird von einer fibrösen Kapsel aus kollagenem Bindegewebe bedeckt (Capsula fibrosa).

1.10.2 Makroskopische Gliederung der Niere

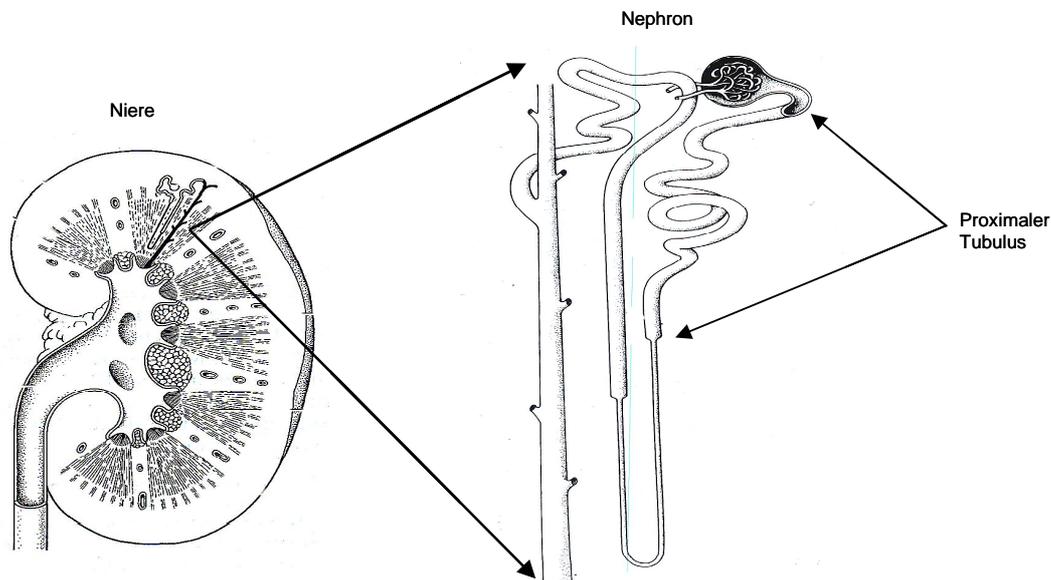


Abb. 3 : Makroskopischer Aspekt der Niere mit Darstellung des Nephron, der kleinsten funktionellen Einheit des Organs, sowie des proximalen Tubulus

Bereits bei makroskopischer Betrachtung eines Querschnittes des Nierenparenchyms lassen sich Nierenrinde, Cortex renalis, und Nierenmark, Medulla renalis, unterscheiden: Das humane Nierenmark enthält ungefähr sieben bis neun konisch geformte Pyramiden, Pyramides renales, deren Spitzen, Papillae renales, in den Sinus renalis hineinragen. Dort werden die Nierenpapillen von den Nierenkelchen umfasst. Auf einer Nierenpapille münden 10-20 Sammelgänge und geben so den Harn in das Nierenbecken. Die Basen der Pyramiden sind der Nierenrinde zugewandt. Von ihnen ziehen Markstrahlen in die Rinde und bilden die sogenannte Pars radiata. Diese ist auch makroskopisch auf einem Nierenschnitt zu erkennen, da sie ausschließlich aus Sammelrohren und gestreckten Tubulusabschnitten besteht. Das Parenchym des Cortex zwischen den Markstrahlen wird vom Rindenlabyrinth gebildet, welches wiederum aus Nierenkörperchen und gewundenen Tubulusabschnitten besteht. Das Rindenparenchym reicht auch seitlich der Pyramiden in den Bereich des Nierenmarks (Columnae renales = Bertini-Säulen). Der Lobus renalis ist die Einheit aus Nierenpyramide und der dazugehörigen Nierenrinde. Desweiteren ist noch zu erwähnen, dass die Niere der Ratte unilobulär ist, d.h. aus nur einer Pyramide und dem entsprechendem Rindenteil besteht. Dagegen hat die menschliche Niere eine multilobuläre Architektur. Bei anderen Säugern sind die Nierenlappen fast komplett durch Bindegewebe separiert (z.B. beim Bär) oder inkomplett

getrennt wie beispielsweise beim Rind. Ontogenetisch werden die Nierenlappen beim Menschen getrennt angelegt, so dass bei der Geburt noch eine gelappte Oberfläche zu erkennen ist. Beim erwachsenen Menschen ist dann allerdings die Oberfläche der Niere glatt und die Lappenarchitektur somit nicht mehr sichtbar.

1.10.3 Nephron und Sammelrohr

Eine Niere besteht aus einem System verschiedener Kanälchen, den Nephronen (etwa 2,5 Millionen Nephrone in beiden Nieren) und den Sammelrohren, die funktionell zusammengehören, weil sie mit dem im Interstitium liegenden Gefäßsystem der Harnbereitung dienen. Der aus dem Blut filtrierte Primärurin wird entlang dieses Kanälchensystems modifiziert, so dass schließlich der Endharn das Pylon erreicht. Dagegen findet entlang der ableitenden Harnwege (Ureter, Harnblase, Urethra) keine weitere Veränderung des Urins statt. Das Nephron kann in verschiedene Abschnitte gegliedert werden:

1. *Nierenkörperchen* (Corpusculum renale, Malphigi-Körperchen): Dieses besteht aus der Bowman-Kapsel, einer einschichtigen Lage platter Zellen (parietales Blatt), in die sich am Gefäßpol eine Kapillarschlinge, das sogenannte Glomerulum einstülpt. Dort geht dann das parietale Blatt der Kapsel in das viszerale (Podozyten) über. Das Glomerulum wird vom Vas afferens gespeist und heraus zieht das Vas efferens. Der Harnpol liegt dem Gefäßpol genau gegenüber und stellt den Beginn des Nierenkanälchens dar.

2. *Nierenkanälchen* (Tubuli renales): Am Harnpol fängt das Hauptstück, Tubulus proximalis mit dem gewundenen Teil (Pars convoluta) und geht in einen morphologisch sowie funktionell gleich gebauten gestreckten Teil (Pars recta) über. Dann folgt ein dünnes Überleitungsstück, der sogenannte dünne Abschnitt der Henle-Schleife (Tubulus intermedius) und geht hinter dem Scheitel der Schleife in das Mittelstück (Tubulus distalis) über. Dieses setzt sich aus einer Pars recta (dicker Teil der Henle-Schleife) und einer Pars convoluta zusammen. Das Verbindungsstück, Tubulus reuniens, ist ein kurzer Abschnitt der in das Sammelrohr übergeht.

Das *Sammelrohrsystem*, Tubulus renalis colligens, besteht aus kortikalen und medullären Abschnitten. Acht bis zehn Nephrone münden in ein Sammelrohr. In den Markstrahlen der Nierenrinde liegen vier bis sechs Sammelrohre zusammen. Im Verlauf durch das Nierenmark vereinigen sich die Sammelrohre und münden schließlich auf der Nierenpapille als Ductus papillaris.

1.10.4 Mikroskopische Anatomie des proximalen Tubulus

Aufgrund der Lokalisation des renalen Natrium-abhängigen Gallensäuren Kotransportsystems im luminalen Bürstensaum des proximalen Tubulus wird im folgenden Abschnitt näher auf die Feinstruktur dieser Nierenzellen eingegangen: der proximale Tubulus stellt den Beginn des Nierenkanälchens dar. Er ist in seinen verschiedenen Abschnitten von einem einschichtigen, jeweils unterschiedlich gearteten, hochdifferenzierten Epithel ausgekleidet. Das Epithel der Pars convoluta ist hochprismatisch bis kubisch. Die Zellen sind bereits lichtmikroskopisch durch den hohen apikalen Bürstensaum zu erkennen. Der Zellkern ist rund und liegt in der Mitte der Zelle. Das azidophile Zytoplasma zeigt eine basale Streifung, die durch die dort massiv vorhandenen längsorientierten Mitochondrien hervorgerufen wird. Der von einer Glykokalix bedeckte Bürstensaum enthält zahlreiche Enzyme, wie z.B. Peptidasen, γ -Glutamyltranspeptidase, alkalische Phosphatase. An der basolateralen Membran der Zellen des Nierenhauptstückes kommt in hoher Zahl die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase vor, sowie v.a. in der Pars recta die γ -Glutamyltransferase. Untereinander sind die Epithelzellen des proximalen Tubulus durch „Gap-junctions“ (Nexus) und durchlässige Zonulae occludentes verbunden. Schließlich ist noch einmal hervorzuheben, dass mit den von morphologisch unterschiedlichen Epithelzellen ausgekleideten Tubulusabschnitten (longitudinale Heterogenität) auch eine funktionelle Heterogenität korreliert. Deswegen wird der proximale Tubulus auch in drei Segmente eingeteilt:

- Segment S1: proximaler gewundener Tubulus
- Segment S2: Mitte des proximal gewundenen Tubulus bis Pars recta
- Segment S3: proximal gestreckter Tubulus

1.10.5 Gefäßversorgung der Niere

Die Nieren werden von ungefähr einem Fünftel des Herzminutenvolumens durchströmt (0,75-1,2 l/min). In fünf Minuten wird somit das gesamte Blutvolumen gefiltert. Daher ist das intrarenale Gefäßbett auch entsprechend ausgedehnt. Es werden dabei zwei hintereinander geschaltete Kapillargebiete (Glomeruli und Tubuluskapillaren) durchströmt. Dabei wird das Blut von harnpflichtigen Stoffen befreit und gelangt über die Vena renalis wieder in die Zirkulation. Nebenbei sei erwähnt, dass der renale Plasmafluss relativ einfach durch Bestimmung der Clearance von PAH, einer Substanz, die glomerulär filtriert und tubulär se-

zerniert, aber nicht tubulär zurückresorbiert wird, festzustellen ist. Die PAH-Clearance liegt beim Gesunden bei 600 ml/min. Beide Nieren werden aus der Arteria renalis versorgt, welche unterhalb der Arteria mesenterica superior aus der Aorta abdominalis entspringt. Am Hilum teilt sie sich in einen vorderen und einen hinteren Ast, aus denen wiederum die Segmentarterien hervorgehen. Darauf folgen die Arteriae interlobares die senkrecht in den Bereich des Cortex ziehen. Sie entlassen die Arteriae arcuatae, aus den wiederum die Arteriae interlobulares entspringen. Diese geben nach allen Seiten Vasa afferentia zu den Glomeruli ab. Nach Passage des Glomerulums geht es über die Vasa efferentia in das venöse System über, welches dem arteriellen System analog aufgebaut ist.

1.11 Physiologie der Nieren

1.11.1 Allgemeines

Die Nieren regulieren lebenswichtige physiologische Abläufe. Zu ihren wesentlichen Funktionen zählen die Regulation der Elektrolyt- und Volumenhomöostase sowie die des Säure-Basen-Haushaltes. Desweiteren scheiden sie wasserlösliche, nicht proteingebundene, Stoffwechselprodukte und körperfremde Stoffe (Pharmaka und Gifte) aus. Außerdem ist die Niere in den Abbau niedermolekularer Plasmaproteine (z.B. β_2 -Mikroglobulin) und Peptidhormone (z.B. Insulin) involviert. Synthese und Freisetzung verschiedener Hormone (Erythropoetin, 1,25-Dihydroxycholecalciferol) und modulierender Faktoren der Regulation des Blutdruckes (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Kallikrein-Kinin-System, Prostaglandine) gehören zu den weiteren Aufgaben dieses Organs. Schließlich ist die Niere das Erfolgsorgan für viele Hormone, die extrarenal gebildet werden (z.B. Aldosteron, Parathormon, ADH, ANP, etc.).

1.11.2 Glomeruläre Filtration

Die hohe Durchblutung der Niere ist die Voraussetzung für eine hohe glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und somit für die Bildung des Primärharns. Durch die Funktion des glomerulären Filters (Kapillarendothel, Basalmembran, Podozyten) ist dieser abgepresste Primärharn beinahe eiweißfrei. Bei diesem Filtrationsprozess spielen der Filtrationsdruck, die Filtrationsfläche und die molekulare Siebfunktion eine Rolle.

1.11.3 Clearance

Mithilfe von Clearancemethoden ist eine quantitative Bestimmung des Glomerulumfiltrates möglich. Dabei entspricht die GFR demjenigen Plasmavolumen das pro Zeiteinheit von einer bestimmten Substanz (z.B. Inulin) geklärt wird („Clearance“) und ist ein Maß für den gebildeten Primärharn. Die Inulinclearance ist identisch mit der GFR und liegt beim Menschen bei 90-140 ml/min. Die Clearance von Paraaminohippurat, welches glomerulär filtrierte und tubulär sezerniert wird entspricht in etwa dem renalen Plasmafluss (RPF = 600 ml/min). Der RPF ist ein Maß für die Nierendurchblutung. Der filtrierte Anteil des Plasmas wird als Filtrationsfraktion (FF) bezeichnet. Diese ist der Quotient aus GFR und RPF und liegt physiologisch bei 0,2.

1.11.4 Flüssigkeitsausscheidung

Es werden täglich etwa 170 l Primärharn gebildet, wovon aber nur ein bis zwei Liter als Urin ausgeschieden werden. Folglich wird von der Niere eine große Rückresorptionsleistung erbracht. 65 % werden im proximalen Tubulus, 20 % in der absteigenden Henle-Schleife und etwa 15 % im distalen Tubulus und Sammelrohr resorbiert. Im distalen Nephron wird die Wasserausscheidung noch durch das antidiuretische Hormon (ADH) moduliert. Darüber hinaus ist die Henle-Schleife mit ihrem Gegenstrom-Prinzip essentiell für die Konzentrierung des Harns.

1.11.5 Elektrolyttransport

Im proximalen Tubulus wird der größte Teil der Elektrolyte, sowie Harnstoff, Aminosäuren, niedermolekulare Plasmaproteine und Glukose resorbiert. Natrium kommt hierbei eine entscheidende Bedeutung zu, da die Rückresorption dieses Ions andere Transporte beeinflusst. Auch der in der vorliegenden Arbeit untersuchte ASBT ist ein im proximalen Nephron exprimiertes Natrium-gekoppeltes sekundär aktives Transportprotein für Gallensäuren. Im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife sitzt ein $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Symporter, der durch seine Transportaktivität bei verminderter Wasserpermeabilität dieses Abschnittes ein hypotonen Harn herstellt, der wiederum die Voraussetzungen zur Konzentrierung oder Verdünnung des Endharns schafft. Dieser Transporter stellt auch den Angriffspunkt der klinisch angewandten Schleifendiuretika (z.B. Furosemid) dar. Die endgültige Zusammensetzung des Endharns geschieht im distalen Tubulus und Sammelrohren, mit Hilfe eines Na^+ -

Cl⁻-Kotransportes und eines Na⁺-H⁺-Antiportes.

1.11.6 Säure-Basen-Haushalt

Die Elimination saurer Valenzen geschieht renal durch verschiedene Mechanismen: Bikarbonat-Resorption, H⁺-Sekretion, Ausscheidung titrierbarer Säuren durch Sekretion von Phosphat als basischen Puffer und Ausscheidung von Ammonium, das aus der Aminosäure Glutamin entsteht und zu H⁺ und NH₃ umgesetzt wird.

1.11.7 Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen

Im Stoffwechsel der Proteine entstehen stickstoffhaltige Endprodukte, die renal ausgeschieden werden und auch wegen ihrer potentiellen Toxizität als harnpflichtig bezeichnet werden. Klinisch sind dabei vor allem Kreatinin, Ammoniak und Harnstoff relevant.

1.11.8 Weitere Aufgaben der Niere

Bei Absinken des Sauerstoff-Partialdruckes wird in der Niere das Erythropoetin (EPO) gebildet, welches wirksam die Bildung roter Blutkörperchen stimuliert. Bei chronischem Nierenversagen entsteht durch die konsekutive insuffiziente EPO-Bildung eine renale Anämie. Außerdem wirkt die Niere im Stoffwechsel der D-Vitamine mit, weil durch Hydroxylierung in der Niere erst das aktive 1,25-Dihydroxycholecalciferol entsteht. Dieses Hormon fördert die Resorption von Kalzium im Darm, steigert die ossäre Mineralisation und hemmt die Sekretion von Parathormon. Eine weitere Aufgabe der Niere ist die Bildung der Peptidase Renin, welche über verschiedene Schritte die Bildung von Angiotensin II fördert. Dieses erhöht durch starke arterielle Vasokonstriktion den peripheren Widerstand sowie den Sympathikotonus und führt somit zu einer Erhöhung des Blutdruckes. Desweiteren stimuliert es in der Nebennierenrinde die Sekretion des Mineralokortikoids Aldosteron. Bei Volumen- und Kochsalzmangel erhöht dieses im distalen Tubulus die Natrium- und Wasserresorption sowie die Kalium- und H⁺-Ausscheidung. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird auch durch Katecholamine über β₁-Rezeptoren aktiviert. Weitere an der Niere angreifende Faktoren in der renalen Blutdruckregulation sind das Kallikrein-Kinin-System und Prostaglandine. Somit wird deutlich, dass die Niere ein zentrales Organ der Blutdruckregulation ist. Schließlich reguliert das hypothalamisch gebildete antidiuretische Hormon (ADH) im distalen Nephron die Wasserpermeabilität dieses Abschnittes je nach

Plasmaosmolalität. Durch diesen kurzen Überblick wird deutlich, dass die Niere vielfältige Aufgaben hat und ihre Funktion für die Homöostase des menschlichen Organismus unentbehrlich ist.

1.12 Bemerkungen zu den verwendeten Substanzen

1.12.1 Allgemeine Wirkungsweise von Steroidhormonen

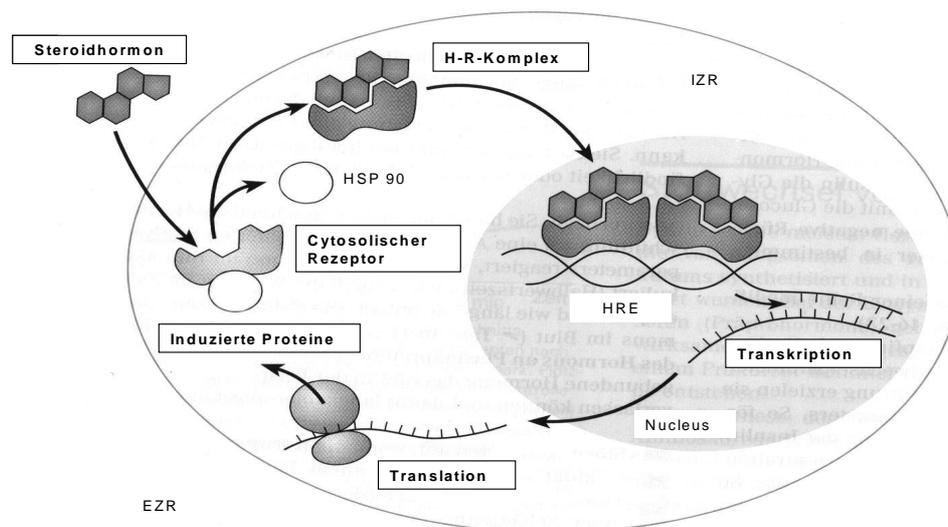


Abb. 4 : Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen

Da Steroidhormone einen lipophilen Charakter haben, können sie ohne Probleme die Zellmembran durchwandern und gelangen so in das Zytosol der Zielzelle. Dort binden sie dann an einen zytosolischen Rezeptor, der durch die Bindung des Hormons eine sterische Konformationsänderung erfährt. Bei diesem Prozess dissoziiert nun das sogenannte Hitzeschockprotein (HSP 90) vom Rezeptor, welches vorher an den freien Rezeptor gebunden war. Nun wandert der Hormon-Rezeptor-Komplex nach Dimerisierung in den Zellkern. Dort bindet dieser dann an einen Bereich der DNA, der als „Hormone Responsive Element“ (HRE) bezeichnet wird. Durch die Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes wird schließlich die Transkription in Gang gesetzt und die entstandene mRNA ins Zytosol transportiert. Durch den Prozess der Translation entstehen jetzt die jeweiligen hormonspezifisch induzierten Proteine. Es sollte aber noch erwähnt werden, dass neuerdings auch sogenannte nicht-genomische Effekte von Steroidhormonen postuliert worden sind, die ihre Wirkung möglicherweise über Membran-Rezeptoren entfalten (63, Review: 85).

1.12.2 Dexamethason: ein hochpotentes synthetisches Glukokortikoid

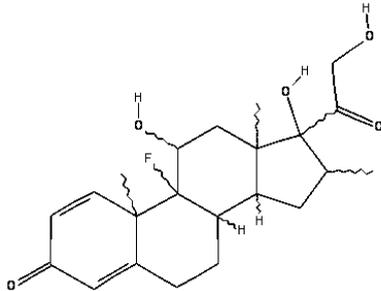


Abb. 5 : *Dexamethason (9α-Fluor-16α-Methyl-Prednisolon)*

Die Leitsubstanz der Glukokortikoide, das endogene Cortisol (Hydrocortison), wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde aus Cholesterin auf den ACTH-Stimulationsreiz der Hypophyse hin gebildet. Die physiologische Cortisol-Inkretion folgt einer zirkadianen Rhythmik, wobei etwa 80 % der Gesamtmenge des Tages morgens zwischen vier und acht Uhr sezerniert werden. Weiterhin ist zu bemerken, dass sich die Abgabe des Glukokortikoids in Stresssituationen bis auf das Zehnfache steigern kann. Cortisol ist ein für das Überleben essentielles Hormon. Bei Nebennieren-Insuffizienz (Morbus Addison) oder operativer Entfernung der Nebennieren muss das Hormon unbedingt substituiert werden, da sein Fehlen sonst zum Tode führt. Ihren Namen haben diese Steroidhormone erhalten, weil sie die hepatische Glukoneogenese stimulieren. Dafür werden in der Peripherie Aminosäuren als Substrat bereitgestellt. So wird in Hungerphasen für einen ausreichenden Glukose-Spiegel im Blut gesorgt. In höheren Konzentrationen entfalten sie ihre antiinflammatorische Wirkung, was therapeutisch von großem Nutzen ist. Cortisol besitzt desweiteren auch eine gewisse Affinität zu Mineralokortikoid-Rezeptoren und kann so zur Retention von Natrium bzw. Ausscheidung von Kalium führen. Dieser mineralokortikoide Partialeffekt ist bei dem synthetischen Dexamethason nicht zu finden.

1.12.3 Testosteron-Propionat: ein männliches Sexualhormon mit langer Halbwertszeit

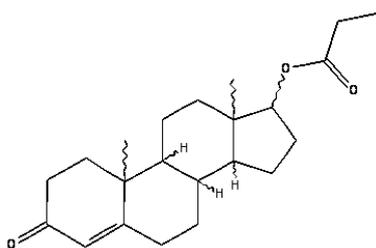


Abb. 6 : *Testosteron-Propionat*

Testosteron ist ein Steroidhormon, welches von den Leydig'schen-Zwischenzellen des Hodens gebildet wird. Diese Produktion wird durch hypophysär ausgeschüttetes LH (luteinisierendes Hormon) ange- worfen. Im geschlechtsreifen Alter werden so beim Mann 5-10 mg des Hormons pro Tag hergestellt. Durch enzymatische Umwandlung durch die 5α-Reduktase wird es in den Zielorganen in die aktive Wirk-

form, das Dihydrotestosteron, umgewandelt. In der fetalen Entwicklung ist das Sexualhormon für die regelrechte Anlage der männlichen inneren und äußeren Geschlechtsorgane bedeutend. Während der Pubertät unterstützt es die Bildung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Desweiteren hat es anabole Effekte, was sich in einer steigenden Skelettmuskelmasse zeigt, es fördert den Schluß der Epiphysenfugen und es regt zusammen mit dem Follikelstimulierendem Hormon (FSH) die Spermatogenese an. Darüber hinaus hat es einen starken Einfluß auf das psychische Erleben und ist für aggressives Verhalten verantwortlich. Bei Frauen führen erhöhte Testosteronspiegel abhängig von der Dosis zur Virilisierung, Veränderungen der Persönlichkeit und zu vermehrter Libido. Testosteron-Propionat entsteht durch Veresterung der 17-OH-Gruppe mit Propansäure. Dadurch wird das Hormon lipophiler (hydrophober) und kann gut als ölige Lösung als Depot subkutan oder intramuskulär injiziert werden. Dadurch verlängert sich die Halbwertszeit auf etwa eine halbe Woche, da das Präparat nur langsam das Depot verläßt und erst im Organismus das reine Testosteron entsteht.

1.12.4 Ethinyl-Estradiol: ein weibliches Sexualhormon mit langer Halbwertszeit

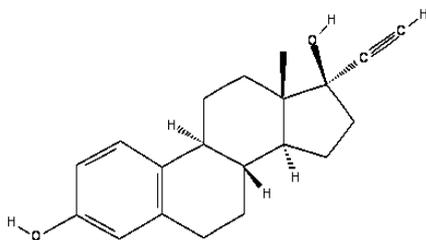


Abb. 7 : *Ethinyl-Estradiol*

Estradiol wird von den tertiären Follikeln der Ovarien unter dem Einfluß des von der Hypophyse gebildeten FSH produziert. Estradiol und andere chemisch verwandte Sexualhormone werden Estrogene genannt. Estradiol hat, wie das Testosteron beim Mann, Einfluß auf die charakteristische weibliche körperliche Entwicklung. Auch die Psyche bzw. das Verhalten werden durch Estradiol geprägt. Dabei ist zu erwähnen, dass die Sexualhormone auch eine direkte zentrale Wirkung haben. Weiterhin fördert Estradiol

das Wachstum des Myometriums der Gebärmutter und ist im geschlechtsreifen Alter für die Proliferation des Endometriums während der ersten Hälfte des Zyklus von Bedeutung. Deswegen führen auch längere Estrogengaben zu einer sogenannten glandulär-zystischen Hyperplasie des Endometriums. Auch der zervikale Schleim und das Epithel der Vagina unterliegen hormonellen Veränderungen. Außerdem sorgt es für die Entwicklung der Milchgänge der weiblichen Brustdrüse. Weiterhin hemmen die Estrogene im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die Ausschüttung von FSH und LH im Hypophysenvorderlappen, so dass ein Regelkreis besteht. Dieses Wirkprinzip wird sich auch

bei der oralen Kontrazeption zunutze gemacht. Beim Ethinyl-Estradiol befindet sich in 17- α -Stellung ein Substituent (siehe Abbildung 7), der die metabolische Stabilität des Hormons erhöht.

1.12.5 Buserelin: ein Gonadoliberin-Analogon

Für die Sezernierung der Gonadotropine (FSH und LH) ist physiologisch eine pulsatile

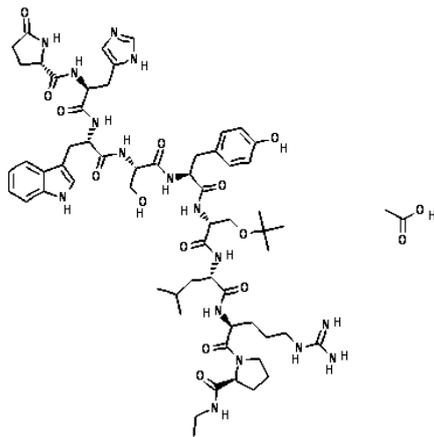


Abb. 8 : *Buserelin-Acetat*

Freisetzung der Gonadoliberine (GnRH = Peptidhormon) der adäquate Stimulus. Diese werden in den hypophysären Pfortaderkreislauf abgegeben.

Bei Verabreichung von sogenannten Gonadoliberin-Analoga werden die Rezeptoren für GnRH auf den Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) desensibilisiert, da diese Substanzen nur langsam metabolisiert werden und eine hohe Affinität zu den Rezeptoren haben. Deswegen werden sie auch als „Superagonisten“ bezeichnet. Durch die Dauerstimulation der HVL-Zellen wird zwar initial die

Gonadotropin-Ausschüttung stimuliert, die jedoch nach nur kurzer Zeit versiegt. Die Wichtigkeit der GnRH-Sekretion (pulsatil vs. dauerhaft) konnte schon im Jahre 1978 an im Hypothalamus geschädigten Rhesusaffen gezeigt werden. Konsekutiv werden auch die Keimdrüsen nach kurzzeitiger Stimulation ihre Funktion aufgeben. Darum spricht man auch von „pharmakologischer“, „hormoneller“ oder „funktioneller“ Kastration. Der Agonist Buserelin unterscheidet sich dabei vom physiologischen GnRH. Ein Glycin in der Mitte des Peptids ist gegen eine D-Aminosäure (D-Serin) ausgetauscht und ein terminales Glycin gegen eine Ethylamid-Gruppe. Durch pulsatile Abgabe des Pharmakons mittels Pumpen über einen subkutanen Katheter ist es also möglich die Keimdrüsenproduktion zu stimulieren. Das Gegenteil kann durch eine Dauerapplikation erreicht werden. Beim Prostatakarzinom können beispielsweise durch Buserelingabe Testosteronspiegel auf Werte, wie nach chirurgischer Kastration gesenkt werden. Dieses ist natürlich auch bei hormonabhängigen Erkrankungen der Frau möglich (Mamma-Karzinom, Endometriose).

1.12.6 ICI 182780 (Faslodex): ein potentes Antiestrogen

Eine andere Möglichkeit die Wirkung von Estrogenen zu antagonisieren besteht in der Verabreichung sogenannter Antiestrogene (Review: 52). Dabei lassen sich bei der Gruppe der synthetischen Antiestrogene nach McGregor und Jordan (77) zwei Gruppen unterscheiden: Zu

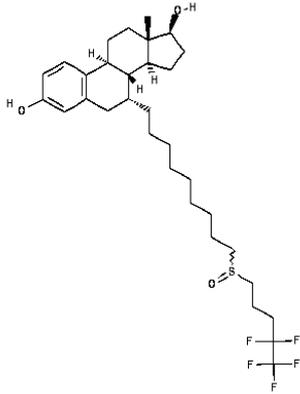


Abb. 9 : Faslodex (ICI 182780)

den Typ I-Antiestrogenen gehören die Substanzen, die experimentell sowohl estrogene als auch anti-estrogene Effekte zeigen. Deswegen werden sie auch selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren (SERMs) genannt. Wirkstoffe dieses Typus sind Tamoxifen, Toremifen, Raloxifen etc. . Bei den Typ II-Antiestrogenen lassen sich unter Laborbedingungen dagegen keine estrogenen Effekte beobachten. Deshalb spricht man hier auch von „reinen Antiestrogenen“. Diese Gruppe wurde im Jahre 1987 entdeckt (133). Die bisher subsummierten fünf

Substanzen dieser Klasse zeigen also alle eine Bindung an den Estrogen-Rezeptor (ER) ohne estrogene Partialeffekte. Dieses konnte sowohl in-vitro als auch in-vivo bestätigt werden. Ihr Gebrauch kann klinisch in der Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs nach Versagen einer Tamoxifen-Therapie liegen (42). ICI 182780 ist ein 7 α -Alkylamin-Derivat des 17 β -Estradiol. Es ist eine Weiterentwicklung des ICI 164384 mit einer verbesserten Bioverfügbarkeit. Durch molekulare Veränderungen wurde die Potenz und die Affinität zum Estrogen-Rezeptor um das vier- bis fünffache erhöht (134).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Vorbemerkungen zu den Versuchstieren

Die proximalen Tubuluszellen wurden aus den Nieren männlicher bzw. weiblicher Sprague-Dawley Ratten mit Gewichten zwischen 240 und 450 Gramm gewonnen. Die Tiere wurden im „Zentrallaboratorium für Versuchstiere, RWTH Aachen“ unter definierten Bedingungen gehalten. Die Beleuchtung des Raumes von 8-20 Uhr sollte den Tieren einen konstanten Tag-Nacht-Rhythmus ermöglichen. Bis zum Beginn der Experimente hatten die Ratten zur Standard-Ratten Nahrung (Altromin Standard Diet, Altrogge, Lage/Lippe) und Wasser freien Zugang.

2.2 Frische Isolierung der proximalen Tubuluszellen

2.2.1 Versuchsaufbau

Ein Becherglas, welches am Boden ein Loch hatte, wurde mit einem Silikonschlauch (Außendurchmesser 2 cm, Innendurchmesser 2 mm, Roth, Karlsruhe) verbunden und in ein auf 37 °C warmes Wasserbad (Ultra-Thermostat NB 5, Colora Messtechnik GmbH) gehängt. Nun wurde der Schlauch in eine Schlauchpumpe (70 W, Desaga, Heidelberg) eingespannt. Der Schlauch endete an einer Luftfalle. Von dieser führte ein Perfusionsschlauch (Rotilaboschlauch aus Polyethylen, Außendurchmesser 0,4 mm, Innendurchmesser 0,1 mm, Roth, Karlsruhe) weg, der später zur Perfusion der Nieren durch die Aorta diente.

2.2.2 Vorbereitungen vor Versuchsbeginn

Vor Beginn der Zellisolierung wurden noch folgende Lösungen angesetzt: 0,029 g EGTA (Ethylen-Glykol-Tetra-Ammonium, Sigma, Taufkirchen) wurden in 150 ml Hanks-Hepes Puffer (HH-Puffer) und 2,5 g Bovines Serum-Albumin (BSA Fraktion V, Roth) in 100 ml HH-Puffer aufgelöst. Darüber hinaus wurden 40 mg lyophilisierte Kollagenase (Worthington Biochemical Cooperation, Freehold, N.J., USA; lot M0A3662) in 30 ml HH-Puffer in Lösung gebracht und 30 ml HH-Puffer in einem kleinen Becherglas, sowie 100 ml Inkubationspuffer (IB-Puffer) in einem Erlenmeyerkolben bereitgestellt. Danach wurden diese Lösungen auf Eis gestellt oder bis zum unmittelbaren Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Aufwärmen

des Wasserbades auf 37 °C wurden die 150 ml EGTA-Lösung in das Becherglas der Versuchsanordnung geschüttet und mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) für einige Minuten begast. Danach wurde die Schlauchpumpe mit einem Durchfluss von 7,5 ml/min angestellt. Dabei hing der Perfusionsschlauch noch im Becherglas, so dass die Lösung zirkulierte. Schließlich wurde noch der pH-Wert der EGTA-Lösung und der anderen vorbereiteten Lösungen mit 1 M NaOH oder 1 M HCl auf physiologische Werte (ca. pH 7,44) eingestellt. Außerdem wurde vor Beginn des Versuches einen Teflonschlauch über einer Bunsenbrennerflamme erhitzt und auf einen Durchmesser von ungefähr 0,3 mm ausgezogen. Dieser dünne Katheter wurde nun auf eine mit Heparin aufgezoogene Spritze (1 ml, 1000 IE Heparin-Natrium, Braun) mit einem Adapterstück aufgesetzt.

2.2.3 Präparation der Tiere

Nach Anästhesie der Ratte mittels intraperitonealer Injektion von Natrium-Thiopental (Trapanal[®], Altana, Dosis: 80 mg/kg Körpergewicht), wurde zunächst die Regio inguinalis

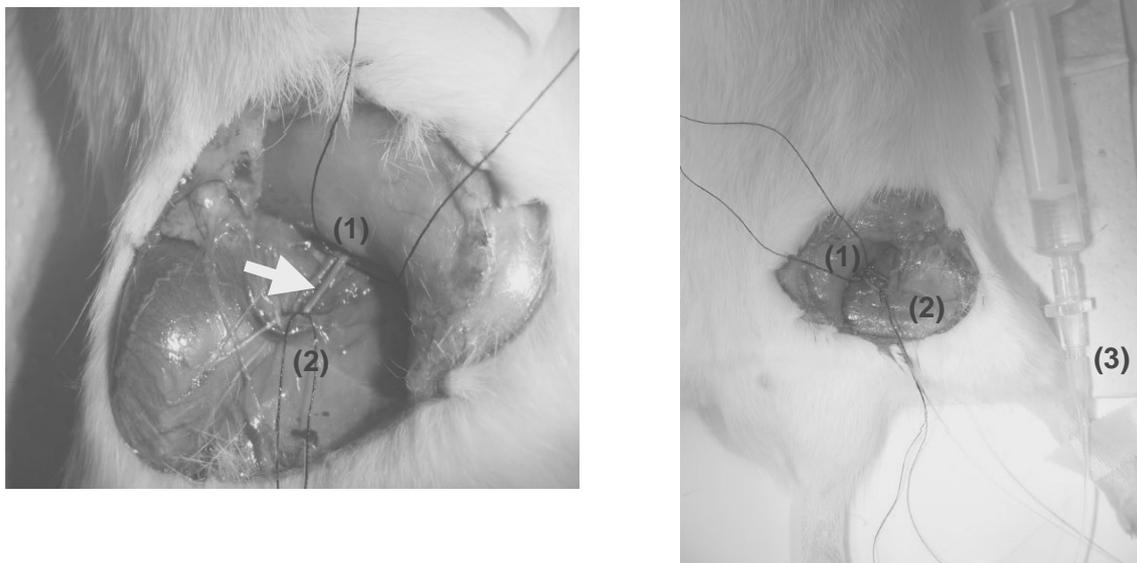


Abb. 10 :
Links: *Inguinalregion* mit A. und V. *femoralis* (weißer Pfeil); Ligaturen (1) und (2).
Rechts: *Heparinkatheter* in der V.*femoralis* (3)

freigelegt (siehe Abb. 10) und die Vena femoralis in der Leistenengegend dargestellt. Für bessere Sichtverhältnisse wurde dabei das Präparationsfeld mit einer Kaltlichtlampe beleuchtet. Danach wurde möglichst weit distal eine Ligatur mit Polyesterfäden um die Vene gelegt, welche sofort geschlossen wurde. Proximal, dicht unterhalb der Leiste, wurde eine

weitere Ligatur gesetzt, die zunächst lose blieb. Nun wurde die Vene mit einer kleinen Gefäßschere inzidiert und anschließend mit dem vorbereiteten Katheter kanüliert, welcher zur intravenösen Applikation des Heparins zur Antikoagulation diente. Die proximale Ligatur wurde nach Entfernung des Katheters geschlossen. Dann wurde die Peritonealhöhle mit einem Schnitt in der Medianlinie eröffnet und der am Mesenterium aufgehängte Darm mit einem Tupfer beiseite geschoben. Die Leber wurde unter dem Zwerchfell mobilisiert und ebenfalls zur Seite gedrängt. So bekam man gute Sicht auf die Nieren und die großen retroperitonealen Gefäße. Als nächstes wurden unterhalb der Nieren die Vena cava inferior und die Aorta abdominalis freigelegt und eine lose Ligatur um beide herum gelegt (Ligatur 1, siehe Abb. 11). Darauf wurden die oberhalb der Nierenarterien liegenden kleinen mesenterialen Äste der Aorta, der Truncus coeliacus und die Arteria mesenterica superior, präpariert und mit einer doppelt geknoteten Ligatur unterbunden (Ligaturen 2 + 3, siehe Abb. 11). Eine weitere lose Ligatur wurde oben, unmittelbar unter dem Zwerchfell, um die Aorta gelegt (Ligatur 4, siehe Abb. 11). Als nächstes wurde diese Ligatur geschlossen, so dass distal davon kein Blutfluss

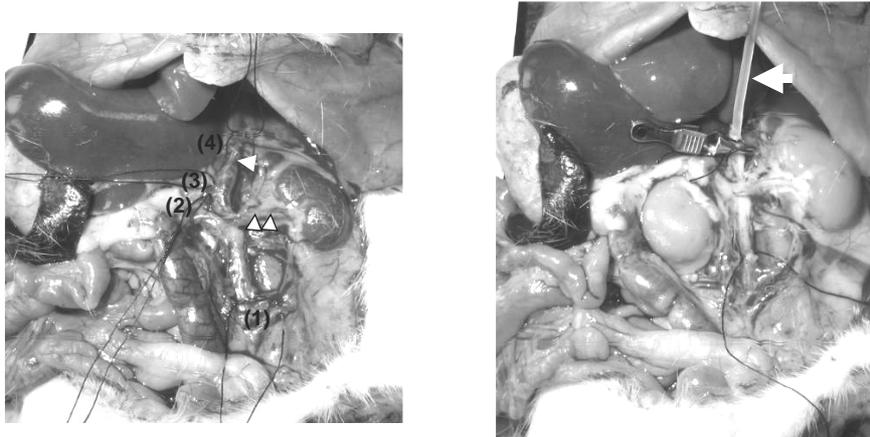


Abb. 11 :

Links: *Situs vor Perfusion mit EGTA-Lösung*. Aorta (Pfeilspitze), linke V.renalis (Doppelpfeilspitze); Ligaturen (1-4).

Rechts: *Situs nach Perfusion mit EGTA-Lösung*: die Nieren sind entblutet. Perfusionsschlauch mit Lage in der Aorta (weißer Pfeil).

mehr in der abdominellen Aorta vorhanden war, und eine kleine Inzision unmittelbar unter dieser Ligatur in die Bauchschlagader vorgenommen. Nun wurde das kleine Loch mit einem gebogenen Häkchen aufgehalten und die Aorta mit dem Perfusionsschlauch oberhalb der Nierenarterien kanüliert. Darauf wurde der nun in der Aorta liegende Schlauch mit einer kleinen Gefäßklemme fixiert, welche mit einer weiteren Ligatur gesichert wurde. Nun wurde

Ligatur Nr.1 geschlossen und ein Schnitt in die linke Vena renalis gemacht, so dass eine Art „Perfusionssystem“ entstand, und der Puffer nach Durchfluss der Nieren aus der Nierenvene herauströpfte. Zuerst wurden die Nieren nun mit EGTA-Puffer (150 ml) durchspült, wobei EGTA als Chelatbildner fungierte, der bevorzugt Calcium-Ionen komplexierte. Die Menge des physiologisch vorhandenen Calciums wurde somit auf ein Minimum reduziert, so dass beispielsweise keines mehr für die Cadherin-Zelladhäsionsverbindungen zur Verfügung stand. Darauf wurden die beiden Nieren zusammen mit dem präparierten Gefäßstiel vorsichtig mit der Schere entlang des Retroperitoneums herauspräpariert (siehe Abb. 12).

2.2.4 Perfusion der Nieren

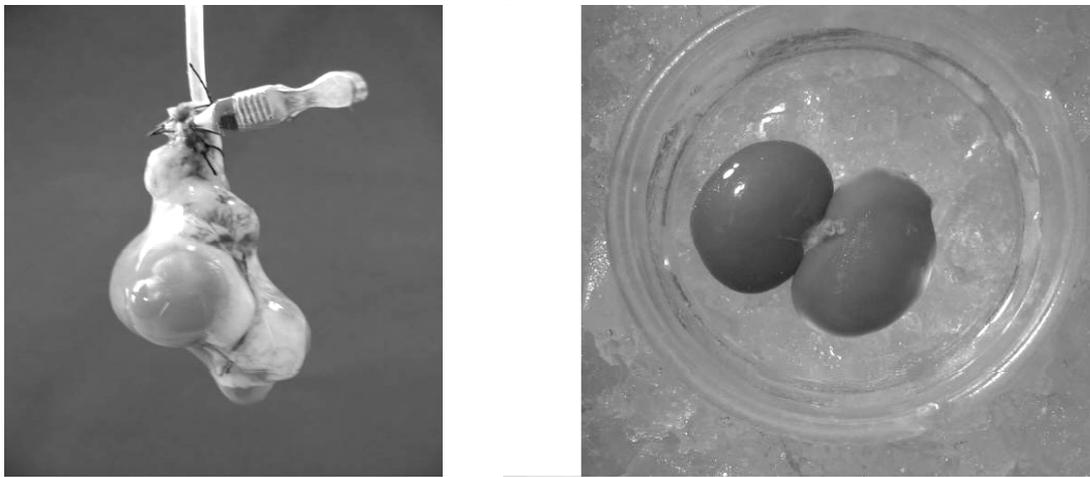


Abb. 12 :
Links: Perfusion der am Gefäßstiel hängenden Nieren mit Kollagenase-Lösung.
Rechts: Nieren im Eisbad (von Kapsel und Bindegewebe befreit)

Danach wurde der Perfusionsschlauch an einem Stativ befestigt. Nach dem Durchfluss der EGTA-Lösung folgte ein Perfusionsschritt mit HH-Puffer (30 ml) um das EGTA wieder herauszuwaschen. In der Zwischenzeit wurden 40 mg Kollagenase in 30 ml HH-Puffer gelöst und 120 μl CaCl_2 hinzugegeben. Wenn der Durchfluss des HH-Puffers durch die Nieren beendet war, ließ man die vorbereitete, mit Carbogen begaste, Kollagenase-Lösung 45 Minuten rezirkulieren, nachdem der pH-Wert auf 7,4 eingestellt wurde und die Nieren über das Becherglas umgehängt wurden. Währenddessen wurden weitere Vorbereitungen getroffen: zu der angesetzten BSA- bzw. IB-Puffer-Lösung wurden jeweils 180 μl bzw. 250 μl CaCl_2 zugegeben und darauf der pH-Wert der Lösungen auf physiologische Werte titriert. Nach dem Verdau wurden die Nieren in eine Petrischale mit etwas vorbereitetem eisgekühlten IB-Puffer gelegt, um die Enzymreaktion der Kollagenase zu stoppen. Danach wurde der Perfusionsschlauch entfernt und das angedaute Nierenparenchym von umgebender Kapsel

und restlichem Bindegewebe befreit (siehe Abb. 12). Nun wurden die grob gesäuberten Nieren in eine Petrischale mit etwas BSA-Lösung überführt. Hier wurde das Parenchym mit Hilfe von verschiedenen großen Pasteurpipetten homogenisiert und Reste des Nierenbecken-Kelchsystems entfernt. So bekam man eine Zellsuspension, die darauf durch ein feines Filtergewebe aus Polyamid-Gaze (Porengröße 80 µm, neoLab) mit BSA-Lösung in vier Reagenzgläser (Sahrstedt-Röhrchen 11,5 ml, 100 x 15,7 mm) filtriert wurde, um dabei kleinere Bindegewebsreste zu entfernen.

2.2.5 Zentrifugation der aufgereinigten Zellsuspension

2.2.5.1 Vorbemerkungen

Zur Gewinnung der proximalen Tubuluszellen aus der Zellsuspension wurde mit einem diskontinuierlichem Gradienten zentrifugiert, da mit einem kontinuierlichen Gradienten keine Auftrennung in verschiedene Banden erzielt werden konnte, wie frühere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten. Beim diskontinuierlichen Gradienten reicherten sich die proximalen Tubuluszellen in einer breiten Bande zwischen den verschiedenen dichten Medien an. Das dabei verwendete nichtionische Nycodenz (5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-triiodo-N,N-bis(2,3-dihydroxypropyl)isophthalamide) hatte keine zelltoxischen Eigenschaften wie verschiedene Arbeiten zeigten (10, 84).

2.2.5.2 Durchführung

Die vier Reagenzgläser, in die die Zellsuspension filtriert wurde, wurden mit etwas BSA-Lösung aufgefüllt, so dass alle einen gleichen Füllstand hatten. Jetzt folgte der erste Waschschrift mittels Zentrifugation (Sigma-Laborzentrifuge 6K10) für 3 Minuten bei 200 g und 4 °C. Nach dem Waschschrift wurde der Überstand abgekippt, die vier entstandenen Pellets auf zwei Reagenzgläser vereinigt und wieder mit etwas Lösung aufgefüllt. Mit der Pasteurpipette wurde das Ganze homogenisiert, erneut für 3 Minuten zentrifugiert und die Überstände abgekippt. Der nächste Schritt war die Vorbereitung zur diskontinuierlichen Dichtegradienten-Zentrifugation: es wurden 2 ml Nycodenz in ein Reagenzglas (RGL 1) vorgelegt und die im ersten Waschgang gewonnenen Zellen mit 4 ml BSA-Lösung hinzupipettiert. Nach Homogenisierung wurden 3 ml davon in ein weiteres Reagenzglas (RGL 2) gegeben. Desweiteren wurden 2 x 830 µl mit 415 µl Nycodenz-Lösung gemischt (RGL 3). Es folgte die Überschichtung der 3ml Zell-/Nycodenzsuspension in RGL 1 und 2

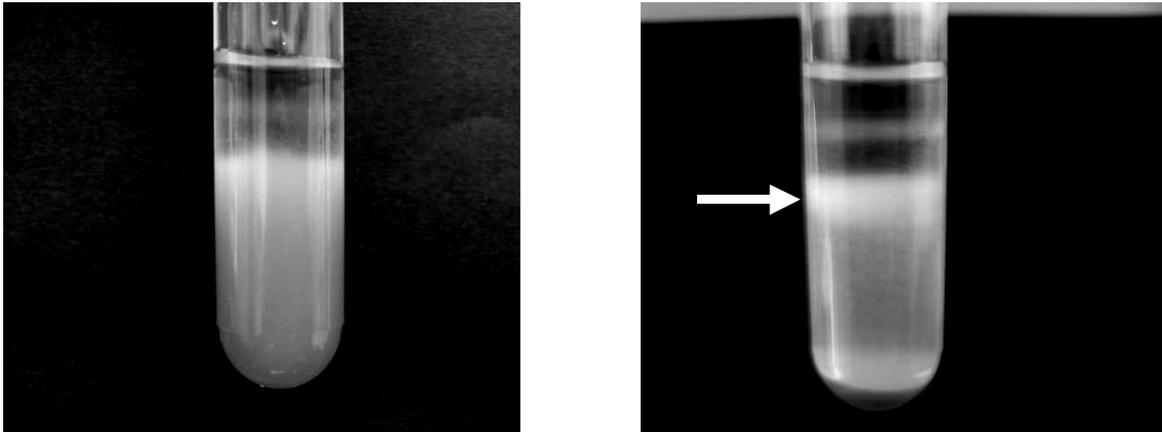


Abb. 13 :

Links: Gewonnene Zellsuspension **vor** Zentrifugation mit einem diskontinuierlichem Dichtegradienten.

Rechts: **Nach** Zentrifugation haben sich die *proximalen Tubuluszellen* in einer dichten Bande angereichert (weißer Pfeil).

mit jeweils 1000 μ l Nycodenz-BSA-Suspension aus RGL 3. Darüber wurden noch 500 μ l reine BSA-Lösung gegeben, so dass man einen diskontinuierlichen Dichtegradienten mit drei verschieden dichten Schichten erhielt. Jetzt wurde 3 Minuten bei 4 $^{\circ}$ C mit 2300 g zentrifugiert. Die proximalen Tubuluszellen, welche die größten Zellen des Nierenparenchyms mit der geringsten Dichte sind, reicherten sich so in einer Bande zwischen den verschieden dichten Lösungen an (siehe Abb. 13). Diese Bande enthielt zu über 90 % Zellen aus dem proximalen Tubulus der Niere (12). Dieses konnte mit spezifischen Markerenzymen nachgewiesen werden (79). Die so gewonnen Zellen wurden vorsichtig mit einer dünnen Pasteur-Glaspipette abgesaugt, in zwei Reagenzgläser pipettiert und schließlich mit etwas IB-Puffer suspendiert. Nach Angleichung der Volumina, folgten zwei weitere Waschschrte im IB-Puffer in der Zentrifuge (4 $^{\circ}$ C, 200 g, 3 Minuten). Das Procedere glich dabei dem ersten Zentrifugationsschritt, mit der Einschränkung, dass dabei die Zellen nicht in BSA-, sondern in IB-Lösung suspendiert wurden. Es ist dabei anzumerken, dass die so frisch isolierten proximalen Tubuluszellen nur eine begrenzte Lebensdauer von wenigen Stunden hatten und der Versuch zügig abgeschlossen werden musste. Zwischendurch wurden die Zellen auf Eis gelagert.

2.2.6 Quantifizierung der proximalen Tubuluszellen

Das gewonnene Zellpellet, welches nun nur noch aus proximalen Tubuluszellen bestand, wurde zur Quantifizierung mit IB-Puffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und mit Hilfe

einer Pasteurpipette homogenisiert. Davon wurden 40 µl Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 740 µl IB-Puffer und 20 µl Trypan-Blau (Sigma), das zur Anfärbung von avitalen Zellen diente (94), pipettiert. Nun wurde eine Neubauer-Zählkammer mit dieser Lösung beladen und dann unter dem Mikroskop bei 500 facher Vergrößerung gezählt. Der Verdünnungsfaktor betrug dabei 1:20. Nach Auszählung der Zellzahl der vier großen Eckquadrate der Neubauer-Zählkammer, folgte die Berechnung der Zellzahl. Das Volumen der Zählkammer von 0,4 µl ergab sich aus einer Höhe von 0,1 mm und der aus gezählten Fläche der vier Großquadrate von 4 mm². Außerdem musste noch der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden:

$$\frac{\text{Anzahl ausgezählter Zellen} \times 1000}{\text{ausgezähltes Volumen (0,4 µl)} \times \text{Verdünnungsfaktor (1:20)}} = \text{Zellzahl / ml Suspension}$$

2.2.7 In vitro-Aufnahmestudien

Die gewonnenen Zellsuspensionen ($2-5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden bei 37 °C unter einer Carbogen-Athmosphäre mit ³H-Taurocholat (Konzentration: 3×10^{-7} mol/l) inkubiert. Der Aufnahmeprozess wurde gestoppt, indem die Zellen in den Reagenzröhrchen nach der Inkubation in ein Eisbad gestellt wurden. Nach einer kurzen Abkühlungszeit wurden die Röhrchen zentrifugiert (4 °C, 3 Minuten, 100 g) und 10 µl des Überstandes wurden zu 5 ml Szintillations-Flüssigkeit (Emulsifier-Safe, Packard Instruments Inc., Groningen, Niederlande). 10 µl des Zellpellets wurden dann ebenfalls zu 5 ml Szintillations-Flüssigkeit hinzu pipettiert. Die Szintillationsröhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um Lumineszenzeffekte zu vermeiden. Am nächsten Tag wurde dann die Radioaktivität in den abgefüllten Röhrchen mit einem „Beckman Liquid Scintillation Counter“ für jeweils 10 Minuten gemessen.

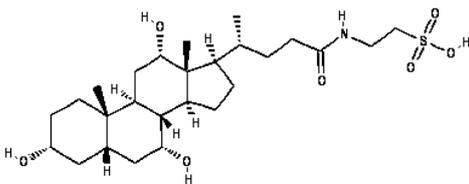


Abb. 14 : Taurocholat

2.3 Clearance-Experimente

2.3.1 Vorbemerkungen

Die Unterbringung und Haltung der Tiere war identisch wie im Abschnitt 2.1 „Vorbemerkungen zu den Versuchstieren“ beschrieben. Die Experimente wurden mit männlichen und weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit Körpergewichten von 240 bis 450 Gramm durchgeführt.

2.3.2 Durchführung

Die Anästhesie der Ratten wurde mit Thiopental (Trapanal[®], Altana) mit einer Dosierung von 80 mg/kg Körpergewicht vorgenommen. Das Narkotikum wurde intraperitoneal injiziert. Nach stumpfer Präparation der Trachea in der medianen Halsregion folgte eine sofortige Tracheotomie mit einer Gefäßschere. Um während der mehrere Stunden dauernden Versuchsperiode weiterhin eine suffiziente Respiration zu gewährleisten, wurde ein kleiner Tubus in die Luftröhre gelegt und mit einer Schlinge fixiert. Der sich ansammelnde Schleim konnte so einfach mit einem auf eine Spritze aufgezogenen Katheters während der Experimente abgesaugt werden. Darauf wurde die linke Vena jugularis interna dargestellt und mit einer Gefäßschere inzidiert, nachdem die Vene distal mit einem Faden ligiert wurde. Das entstandene Gefäßloch wurde mit zwei dünnen Katheter kanüliert, damit gleichzeitig ein Zugang zur Infusion und Applikation von Substanzen bestand. Anschließend wurden beide Katheter mittels einer weiteren Ligatur in ihrer Lage gesichert. Jetzt wurde die Harnblase durch einen suprapubischen abdominellen Schnitt freigelegt und zur Harnableitung ebenfalls mit einem Katheter kanüliert. Der Totraum der Harnblase wurde mittels einer Ligatur minimiert, welche so den größten Teil der Blase ausschloss (38). Darüber hinaus wurde bei den männlichen Ratten noch die Urethra ligiert. Während des Experimentes wurde das Versuchstier auf einem kleinen Heiztisch gelagert, um eine konstante Körpertemperatur von beizubehalten. Nach dieser chirurgischen Operation zur Vorbereitung des eigentlichen Versuches erhielten die Tiere 1 ml/100 g Körpergewicht isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) intravenös und eine „priming“-Dosis ³H-Taurocholat (10 µCi). Anschließend wurde isotonische Kochsalzlösung, die ³H-Taurocholat enthielt mit einer Flussrate von 5,4 ml/h infundiert. Die Experimente starteten schließlich nach einer Äquilibrationsperiode von 45 Minuten: Es wurde dann für ein Zeitintervall von 10 Minuten Urin gesammelt. Das Urin-

volumen wurde gravimetrisch bestimmt. In der Mitte der Sammelperiode (nach 5 Minuten) wurde aus der Schwanzvene mit Hilfe von drei Hämatokritröhrchen 100 µl Blut gewonnen. Das Blut wurde darauf in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß umgefüllt und daraus das Plasma mittels Zentrifugation gewonnen. 20 µl des Urins bzw. des Plasmas wurden in entsprechende Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillations-Flüssigkeit (emulsifier-safe, Packard Instruments Inc., Groningen, Niederlande) überführt. Die Messung der Radioaktivität des ³H-Taurocholat wurde in einem Szintillationszähler (Beckmann liquid scintillation counter, Fullerton, USA) für 10 Minuten durchgeführt. Die Berechnung der Taurocholatclearance erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Clearance}_{\text{TC}} = \text{Harnfluss} \times \frac{{}^3\text{H-Taurocholat-Konzentration im Harn}}{{}^3\text{H-Taurocholatkonzentration im Plasma}}$$

Dabei wurde die Clearance für das freie, nicht proteingebundene Taurocholat berechnet. Die Taurocholat-Proteinbindung wurde mittels Ultrafiltration des Serums bestimmt („Centrifree Micropartition“, Millipore, Schwalbach). Das Gerät wurde mit einem Minimum von 200 µl Serum beladen und für 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert.

2.4 Western Blot-Experimente

2.4.1 Vorbemerkungen

Mit einem Western Blot können spezifische Proteine aus einem Proteingemisch detektiert und quantifiziert werden. Diese Detektion wird mit Antikörpern durchgeführt, die gegen Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins gerichtet sind und deshalb auch „Immunoblot“ genannt wird. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt im Bereich von Nano- und Pikogramm. Der Western Blot lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: Als erstes wird die Auftrennung des Proteingemisches mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Dann folgt der Transfer der Proteine auf eine Membran und zuletzt die Detektion des Zielproteins.

2.4.2 Vorbereitung der Proben

Nach Durchführung der Zellisolierung wurden 5 Millionen Zellen aus der Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Dann wurde dieses drei Minuten zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Nun wurde zu dem Zellpellet 1 ml SDS-Puffer gegeben und homogenisiert, so dass wieder eine Zellsuspension entstand und diese anschlies-

send für fünf Minuten aufgeköcht. Durch die Hitze wurden die Proteine denaturiert. Zuletzt wurde der Inhalt in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bei -70°C bis zum Beginn des Western Blots eingefroren. Als Größenstandard für das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurden vorgefärbte Standardproteine verwendet (Bio-Rad, Kaleidoscope Prestained Standards).

2.4.3 Auftrennung des Proteingemisches

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte mittels einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei wurden die Proteine nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Das Polyacrylamid bildete im Gel ein Netzwerk aus engen Maschen. Nach Anlegen einer Spannung wanderten nun kleine Proteine schneller als größere durch das maschenartige Gel. So bekam man deutlich voneinander abgrenzbare Proteinbanden.

2.4.4 Membrantransfer

Die Blotapparatur wurde wie folgt aufgebaut: zwischen die beiden Kunststoffgitter einer Gelkassette kamen ein Schaumstoffschwamm, drei bis vier Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes Filterpapier, schließlich das Gel und eine Nitrozellulose-Membran (Protan, Transfermembran; Schleicher & Schuell). Alle Utensilien wurden zuvor in Transferpuffer getränkt bzw. abgespült. Dieses „Sandwich“ wurde dann luftblasenfrei in einen mit Transferpuffer gefüllten Blotting-Tank eingesetzt. Dabei zeigte die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode. Der eigentliche Transfer der Proteine auf die Membran (Blot) erfolgte elektrophoretisch (2 Stunden, 200 mA).

2.4.5 Proteindetektion

Der Blot wurde nun zweimal mit TBS pH 7,5 gewaschen. Darauf folgte der eigentliche Schritt der Immundetektion. Dazu musste zunächst die Membran abgesättigt werden (Blocking), um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Dazu wurde in TBST gelöstes Bovines Serumalbumin (BSA) benutzt. Es wurde dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln mit der Blocking-Lösung inkubiert. Nach dem Blocken wurde die Membran in TBST pH 7,5 gewaschen (zweimal 10 Minuten). Nun folgte der eigentliche Nachweis des für uns relevanten ASBT-Proteins auf der Membran. Dieses geschah durch eine indirekte Antikörpermarkierung des Proteins in zwei Schritten. Nach

Inkubation mit einem antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörper (polyklonaler Kaninchen- ASBT-Antikörper; Verdünnung 1:500; Bioscience Göttingen), erfolgte die Detektion mit einem weiteren speziesspezifischen, markierten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG), welcher an den F_c-Teil des Primärantikörpers band. Der Primärantikörper war gegen die letzten 14 Aminosäuren des C-terminalen Endes des ASBT der Ratte gerichtet. Zur Inkubation wurde nach dem Blocking die Primärantikörperlösung auf die Membran gebracht und über Nacht im Horizontalschüttler bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung dreimal bei Raumtemperatur für 5-15 Minuten mit TBST pH 7,5 gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder dreimal gewaschen (5-15 Minuten in TBST pH 7,5). Die Detektion erfolgte darauf mittels einer Nachweisreaktion in der das Enzym Merretich-Peroxidase H₂O₂ und Luminol zu einem lumineszierenden Produkt umsetzt. Dazu wurden die beiden ECL-Substratkomponenten in einem Falcon-Tube mit Hilfe des Vortex gut gemischt und in eine Schale gegeben. Der Blot wurde nun für eine Minute im Dunkeln in dieser Detektionslösung inkubiert. Die Lumineszenz wurde bei den Western Blots zu den Glukokortikoid-Versuchen mit einem Film nachgewiesen. Bei den Sexualhormon-Versuchen erfolgte die Quantifizierung der Lumineszenz mit Hilfe einer CCD-Kamera (LAS-3000) und der speziellen Auswertesoftware AIDA Version 4.00 (raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

2.5 Chirurgische Ovariectomie und chirurgische Adrenalectomie

2.5.1 Vorbemerkungen

Die chirurgische Ovariectomie ist ein in der Literatur schon lange praktiziertes Verfahren, um beispielsweise die Minderung der Knochenmasse an Ratten zu studieren (44, 51, 61, 65). Die Anästhesie der Tiere wurde mit 200 µl 10 % Ketamin-Hydrochlorid (Ketamin 10 %, Sanofi Ceva) und 50 µl 2 % Xylazin-Hydrochlorid (Rompun[®], Bayer) durchgeführt (Mischungsverhältnis 4:1). Während der Operation wurden die Ratten auf einem kleinen Heitzisch mit einer Temperatur von 37 °C gelagert, um eine Hypothermie der Tiere während des Eingriffs zu vermeiden.

2.5.2 Durchführung der Ovariectomie

Zunächst wurde die Haut auf beiden Seiten lateral der Wirbelsäule und kaudal des Thorax rasiert. Danach wurde der rasierte Bereich mit Povidon-Iod gereinigt. Nun setzte man einen kleinen 1-2 cm langen Hautschnitt. Falls nötig wurde noch das subkutane Fettgewebe abpräpariert, um schließlich die seitliche abdominale Muskulatur freizulegen. Jetzt wurde die abdominale Wand mit einer Pinzette gegriffen und somit vom peritonealen Inhalt abgehoben, so dass die Muskulatur ohne Verletzung innerer Organe inzidiert werden konnte. Man bekam so einen guten Einblick auf den parametranen Fettkörper und konnte so mit der Pinzette ein Fettbündel herausziehen. So ließen sich Eileiter und Ovar problemlos lokalisieren. Mit chirurgischen Fadenmaterial (Perma-Handseide, Ethicon) wurde eine Ligatur um den Eileiter gelegt. Eine weitere wurde um die Arteria bzw. Vena ovarica gelegt, die ebenfalls in dem Fettgewebe von kranial zum Ovar verliefen, um eventuelle Blutungskomplikationen zu vermeiden. Schließlich ließ sich das Ovar ohne Probleme zwischen den gelegten Ligaturen herausschneiden. Danach wurde das Fett und die Tuba uterina zurück in die Peritonealhöhle geschoben und die abdominale Muskulatur mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Haut wurde darauf mit derselben Nahttechnik versorgt. Das Wundareal und das angrenzende Fell wurde mit Alkohol bzw. destilliertem Wasser gereinigt. Die oben beschriebene Prozedur wurde nun mit der anderen Seite wiederholt. Zum Aufwachen und zur Erholung wurde die Ratte allein in einen warmen Käfig gesetzt. Postoperativ folgte eine tägliche Wundinspektion und in den ersten Tagen nach der Operation eine analgetische Therapie mit subkutaner Applikation von Tramadol in einer Dosis von 15-20 mg/kg alle 10-12 Stunden (Tramal® 100 mg, Grünenthal).

2.5.3 Durchführung der Adrenalectomie

Die Vorbereitung der Tiere zur Operationen (Anästhesie, Operationsareal) glichen denen bei der Ovariectomie (s.o.). Nach Inzision der Haut lateral der Wirbelsäule kaudal der letzten Rippe und Präparation des subkutanen Fettgewebes, wurde ein kleiner Schnitt in die seitliche Muskulatur der Bauchhöhle in dieser Region vorgenommen. Nun bekam man einen Blick auf das retroperitoneale Fettgewebe und die Niere. Darauf suchte man am kranialen Pol die etwas nach medial verlagert die Nebenniere auf, welche sich als kugeliges etwa 2-3 mm großes Organ gut abgrenzen ließ. Nach Ligatur der kleinen Nebennieren-Arterien mit chirurgischem

Nahtmaterial, konnte man das Organ vorsichtig mit einer Pinzette von der Nierenkapsel ablösen und entfernen. Der Wundverschluss und die postoperative Überwachung glichen wiederum denen bei der Ovariectomie. Es sollte aber noch erwähnt werden, dass die adrenalectomierten Tiere postoperativ physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) zum Ausgleich der Elektrolyte aufgrund der nun fehlenden Regulation durch Mineralokortikoide (Aldosteron) erhielten. Die Effizienz dieser Operation wurde durch Bestimmung der Serumkonzentration von Aldosteron - mit freundlicher Hilfe des Institutes für klinische Chemie der RWTH-Aachen - überprüft, welches an der unteren Nachweisgrenze des verwendeten Testkits lag (n=2). Es ist anzumerken, dass aufgrund von Kosten und ethischen Aspekten die Bestimmung nicht an einer größeren Anzahl von Tieren durchgeführt worden ist.

2.6 Implantation osmotischer ALZET®-Minipumpen

2.6.1 Vorbemerkungen

Es wurden ALZET®-osmotische Miniaturpumpen verwendet, die eine kontinuierliche Applikation von Substanzen in kontrollierten Raten bei den weiblichen Sprague-Dawley Ratten ermöglichten. Bei subkutaner Implantation diente die Pumpe als Quelle zur prolongierten Verabreichung des GnRH-Analogons Buserelin. Somit stellte diese Methode eine gute Alternative zu wiederholten Injektionen dar, weil so der Stress für das Tier auf ein Minimum reduziert wurde. Während der Behandlungsperiode wurden keine externen Verbindungen benötigt, so dass die Tiere nicht in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wurden.

2.6.2 Funktionsweise

Die Pumpe bestand aus drei konzentrischen Schichten: einem Reservoir für das zu applizierende Buserelin (200 µl Volumen), einer osmotischen Muffe und einer semi-permeablen Membran, welche die Abgaberate des GnRH-Analogons kontrollierte (0,25 µl/h). Daraus resultierte eine maximal mögliche Behandlungsdauer von 28 Tagen.

2.6.3 Subkutane Implantation der mit Buserelin befüllten Minipumpen

Die beste Stelle zur Implantation der ALZET-Pumpe bei den Ratten lag am Rücken unterhalb der Scapula, da so verhindert wurde, dass die Pumpe auf vitale Organe drückte oder die Respiration beeinträchtigte. Bei dieser Implantationstechnik gab die Pumpe das Buserelin

kontinuierlich in den subkutanen Raum ab. Dort wurde das GnRH-Analogon schließlich durch lokale Kapillaren absorbiert und gelangte so in die systemische Zirkulation. Die chirurgische Implantation lief in folgenden Schritten ab: Nach Anästhesie der Ratte mittels 200 µl 10 % Ketamin-Hydrochlorid (Ketamin 10 %, Sanofi Ceva) und 50 µl 2 % Xylazin-Hydrochlorid (Rompun[®], Bayer) in einem Mischungsverhältnis von 4:1 wurde die Haut über der Operationsstelle rasiert und mit Povidon-Iod gereinigt. Während der Operation wurden die Ratten auf einem kleinen Heiztisch mit einer Temperatur von 37 °C gelagert, um eine Hypothermie der Tiere während des Eingriffs zu vermeiden. Es folgte die Inzision der Cutis auf der ausgewählten Seite für die Pumpenimplantation am Rücken in der Skapularlinie. Dann wurde die Präparationsschere in die Subkutis durch den kleinen Hautschnitt eingeführt und durch mehrmaliges Abspreizen der Scherenblätter eine Tasche für die Pumpe freipräpariert. Dann konnte diese im befüllten Zustand eingesetzt werden. Um die Wundheilung zu gewährleisten, geschah dies in einiger Entfernung von der Hautinzisionsstelle. Schließlich erfolgt der Verschluss der Haut mit ein bis zwei Einzelknopfnähten (Perma-Handseide, Ethicon). Zum Aufwachen und zur Erholung wurde die Ratte allein in einen warmen Käfig gesetzt. Postoperativ folgte eine tägliche Wundinspektion und in den ersten Tagen nach der Operation eine analgetische Therapie mit subkutaner Applikation von Tramadol in einer Dosis von 15-20 mg/kg alle 10-12 Stunden (Tramal[®] 100 mg, Grünenthal).

2.7 Bestimmung der Gallensäuren im Serum

Zur Bestimmung der Gallensäuren im Serum, der mit Ethinyl-Estradiol behandelten männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde der vollenzymatische Farbttest „Merckotest“ der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Bei diesem Test wurden 3-alpha-Hydroxy-Gallensäuren in Gegenwart von NAD⁺ mit Hilfe der 3-alpha-Hydroxysteroid-dehydrogenase (3-a-HSD) spezifisch zu den entsprechenden 3-Keto-Derivaten umgesetzt. Das dabei gebildete NADH reagierte mit Nitrotetrazolium-Blau (NTB) unter der katalytischen Wirkung von Diaphorase zu einem blauen Formazan-Derivat, welches photometrisch bestimmt werden konnte.

3- α -HSD



2.7.1 Konzentration der Reaktionslösungen

Phosphat-Puffer (pH 7,0)	65 mmol/l
3-a-HSD	≥ 20 U/l
Diaphorase	125 U/l
NAD	1 mmol/l
NTB	0,3 mmol/l
Inaktivator für andere NADH-produzierende Enzyme, Stabilisatoren	

2.7.2 Durchführung

Die photometrische Messung wurde mit einem Extinktionsmaximum von 500 nm und dem Filter Hg 546 bei einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

	Probe	Probenleerwert
Serum / Standard	100 μ l	100 μ l
Proben-Reaktionslösung (1)	250 μ l	-
Leerwert-Reaktionslösung (2)	-	250 μ l
Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur oder 15 Minuten bei 37 °C.		
Stopp-Reagenz (3)	250 μ l	250 μ l
Messung der Extinktion der Probe (E_P) gegen den Probenleerwert (E_{PL}) innerhalb 8 Stunden bei Aufbewahrung bei +20 bis +25 °C bzw. innerhalb 24 Stunden bei +2 bis +8 °C messen.		
$E = E_P - E_{PL}$		

2.7.3 Auswertung

Die Gallensäuren-Konzentration im Serum wurde graphisch über eine Standardkurve ermittelt, welche für jede Serie neu zu bestimmen war. Es wurden dabei die einzelnen Konzentrationen der Standards graphisch gegen die zugehörigen Extinktionsdifferenzen aufgetragen ($E_{St} = E_{StP} - E_{StPL}$). Aus der somit erhaltenen Standardkurve konnte man nun direkt aus der Extinktion E der Probe die Konzentration der Gallensäuren im Serum ($\mu\text{mol/l}$) ablesen.

2.8 Verwendete Substanzen

2.8.1 Radioaktiv markierte Substanzen

- ^3H -Taurocholat, spezifische Aktivität 50 und 25 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA

2.8.2 Unmarkierte Substanzen

- Kollagenase, lot M0A3662, Worthington Biochemical Cooperation, Freehold, New Jersey, USA
- Testosteron-Propionat, Sigma, Taufkirchen
- Ethinyl-Estradiol, Sigma, Taufkirchen
- ICI 182780 (Faslodex), Biotrend, Köln
- Buserelin-Acetat, als freundliche Gabe von Intervet, Unterschleißheim
- Dexamethason, Sigma, Taufkirchen

Alle anderen Chemikalien wurden von Standardquellen in höchster Reinheit bezogen.

2.8.3 Zusammensetzung der Lösungen

Hanks-HEPES Puffer (in mM, pH 7,4) :

- | | |
|---|------|
| - NaCl | 137 |
| - KCl | 5 |
| - $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,8 |
| - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,33 |
| - KH_2PO_4 | 0,44 |
| - NaHCO_3 | 26 |
| - Hepes | 25 |

Inkubationspuffer (IB, in mM) :

- NaCl	117,5
- KCl	4
- KH ₂ PO ₄	0,95
- MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2
- NaHCO ₃	22,5
- Glucose x H ₂ O	11,1

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 100 ml des Puffers 250 µl 1 M CaCl₂ hinzugeben !

BSA-Puffer:

- HH-Puffer	100 ml
- BSA	2,5 g

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 100 ml des Puffers 180 µl 1 M CaCl₂ hinzugeben !

Nycodenz-Puffer (in mM) :

- KCl	6,7
- CaCl ₂ · H ₂ O	1,22
- Hepes	10

Nycodenz-Lösung (1):

- Nycodenz-Puffer	10 ml
- Nycodenz	3,4 g

Nycodenz-Lösung (2):

- BSA-Puffer	2 x 830 µl
- Nycodenzlösung (1)	415 µl

2.8.4 Material Western Blot

SDS-Puffer (2 ml) :

- Aqua-Bidest	1,76 ml
- Tris-Puffer pH 7,4	40 µl
- SDS 10 %	200 µl
- PMSF (Proteasehemmer)	20 µl

In 1 ml des Puffers wurden 5 Millionen frisch isolierte proximale Tubuluszellen verarbeitet.

Transferpuffer

Tris pH 8,8	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %
SDS	0,1 %

TBS pH 7,5 (in mM) :

- Tris-Base	50
- NaCl	150

TBST pH 7,5:

- Tween-20	0,1 % (v/v) in TBS gelöst
------------	---------------------------

Blocking-Lösung:

- BSA	3 % (w/v)
- TBST	40 ml

Inkubations-Lösung (primärer Ak):

- BSA	5 % (w/v)
- polyklonaler anti-rat-ASBT-Ak (Kaninchen)	1:500
- TBST	10 ml

Inkubations-Lösung (sekundärer Ak):

- Anti-Kaninchen-IgG-Ak	1:2000
- Magermilchpulver	5 % (w/v)
- TBST	20 ml

ECL-Substratkomponente (1):

- Tris-HCl (pH 8,5)	100mM
- H ₂ O ₂	5,5 µM
- gelöst in Aqua-Bidest	

ECL-Substratkomponente (2):

- Tris-HCl (pH 8,5)	100mM
- Luminol (250 mM)	2,5 mM
- p-Cumarinsäure (90 mM)	400 µM
- gelöst in Aqua-Bidest	

Luminol-Lösung (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazinedione):

- Luminol	250 mM
- gelöst in DMSO	

p-Cumarinsäure-Lösung (4-Hydroxy-Zimtsäure) :

- p-Cumarinsäure 90 mM
- gelöst in DMSO

Die Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Statistik

2.9.1 Vorbemerkungen

Die statistische Testung wurde mit der Anzahl der Tiere in den jeweiligen Gruppen durchgeführt. Die einzelnen Werte einer Versuchsserie wurden im Kapitel „Ergebnisse“ als arithmetische Mittelwerte und dem Standardfehler der Mittelwerte ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) angegeben. Der SEM ergibt sich aus der Standardabweichung dividiert durch die Wurzel der Anzahl der Proben:

$$\text{SEM} = \sigma \frac{1}{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

wobei σ geschätzt wird als:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde bei wiederholten Messungen mit Hilfe der ANOVA (Analysis of Variance) gefolgt vom „Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test“ (Sexualhormon-Versuche) bzw. dem Student-t-Test für unverbundene Stichproben (Glukokortikoid-Versuche) geprüft. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant angesehen. Die Statistik wurde mit dem Programm Instat[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, Calif., USA) berechnet.

2.9.2 Varianzanalyse

Bei der Untersuchung der geschlechtsspezifischen Effekte auf den renal tubulären Taurocholattransport wurden die Stichproben mittels der Varianzanalyse (ANOVA) auf ihre Signifikanz hin untersucht. Bei der Varianzanalyse wird zum Vergleich zweier Varianzen der F-Wert angegeben:

$$F = \frac{(n - k) \left(\sum_{i=1}^k \frac{S_i^2}{l_i} - \left(\frac{S^2}{n} \right) \right)}{(k - 1) \left(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{l_i} x_{ij}^2 - \sum_{i=1}^k \frac{S_i^2}{l_i} \right)}$$

Zeigte sich der p-Wert nach der Varianzanalyse signifikant ($< 0,05$), wurde mittels des „Student-Newman-Keuls Test“ untersucht, ob sich die einzelnen Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden.

2.9.3 Unverbundener Student's t-Test

Zum Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben wurde der unverbundene Student's t-Test verwendet. Dieses geschah bei den Versuchen zur Regulation durch Glukokortikoide. Dabei wurde die Nullhypothese auf die Gleichheit der den beiden Stichproben zugehörigen Mittelwerten der Grundgesamtheiten geprüft. War der zu prüfende Quotient kleiner als das Signifikanzniveau, wurde die Nullhypothese nicht abgelehnt. Der Quotient t ergibt sich aus :

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{\sqrt{\left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right] \times \left[\frac{(n_1 - 2) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]}}$$

3. ERGEBNISSE

3.1 Vorbemerkungen

Die im folgenden beschriebenen Transportstudien sind statistisch mit dem ANOVA-Test ausgewertet worden, d.h. alle Gruppen sind auf ihre statistische Signifikanz untereinander geprüft. Aus Gründen der Anschaulichkeit wurden allerdings in den graphischen Abbildungen nur die jeweils für das Kapitel relevanten Gruppen dargestellt.

Bei den Transportstudien zum tubulären Taurocholattransport wurde in allen Versuchsgruppen die unspezifische Taurocholat-Aufnahme bestimmt. Dazu wurde die ³H-Taurocholatakkumulation in Anwesenheit einer hohen Konzentration unmarkiertem Taurocholates (10^{-3} M) bestimmt. Die unspezifische Aufnahme lag dabei jeweils im Bereich von 10-20 % der Gesamtaufnahme. Diese wurde bei allen Versuchen von der Gesamtaufnahme subtrahiert, so dass im folgenden nur die spezifische Taurocholat-akkumulation angegeben ist.

3.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im renal tubulären Taurocholattransport

3.2.1 Transportstudie an unbehandelten männlichen bzw. weiblichen Ratten

Versuchsablauf:

Nachdem die Isolierung der proximalen Tubuluszellen durchgeführt wurde, wurde die gewonnene Zellsuspension mit 10 µl ³H-Taurocholat für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert.

Ergebnisse:

Der Akkumulationsfaktor bei männlichen Kontrollratten (n=10) lag bei $5,63 \pm 0,28$ (MW \pm SEM). Dagegen ergaben sich bei den weiblichen Ratten folgende Werte: $3,68 \pm 0,43$ bei einer Anzahl von n=8. Bei Testung mit dem ANOVA erhielt man ein $p < 0,01$. Somit gab es einen deutlich signifikanten Unterschied in der ³H-Taurocholatakkumulation weiblicher gegenüber männlichen Ratten.

Akkumulationsfaktoren		
	Kontrolle Männlich	Kontrolle Weiblich
MW	5,63	3,68
SEM	0,28	0,43
n	10	8
p	< 0,01	

Tab. 1 : Einfluss des Geschlechts von Sprague-Dawley Ratten auf die tubuläre ^3H -Taurocholat-Aufnahme. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ^3H -Taurocholat-Konzentration zur ^3H -Taurocholat-Konzentration in der Badlösung dar.

^3H -Taurocholat-
Akkumulationsfaktor

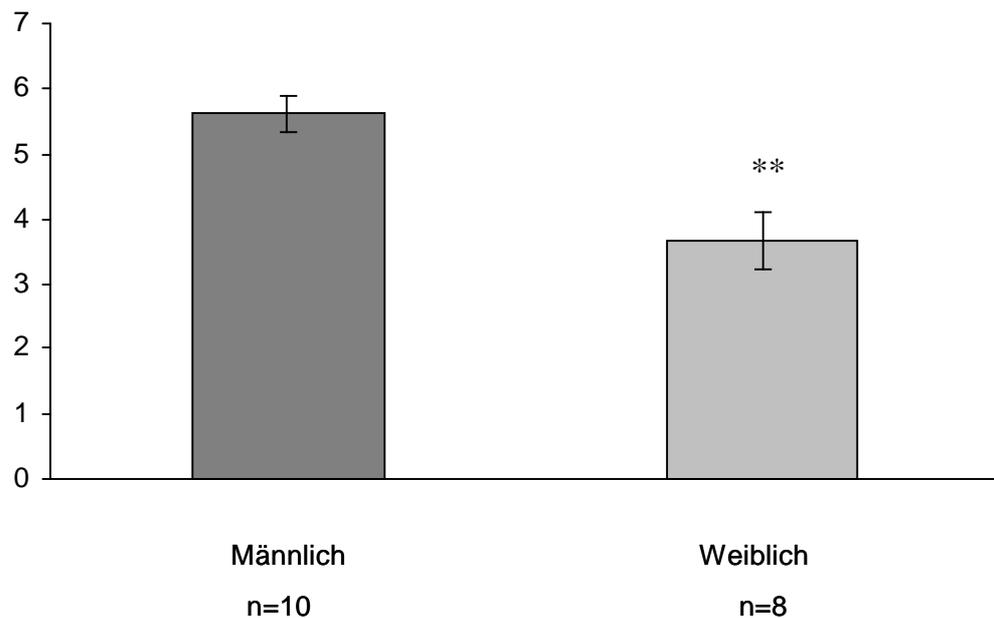


Abb. 15 : Graphische Darstellung der ^3H -Taurocholat-Akkumulationsfaktoren, die in den Zellsuspensionen der isolierten proximalen Tubuluszellen der männlichen und weiblichen Ratten gemessen wurden (MW \pm SEM): die weiblichen Tiere hatten einen um 35 % niedrigeren Akkumulationsfaktor als die männlichen Ratten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Somit konnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied in Bezug auf die Taurocholat-Aufnahme proximaler Tubuluszellen gezeigt werden.

** : p<0,01

3.2.2 Einfluss von Testosteron auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten

Versuchsablauf:

Die weiblichen Ratten (Gewicht 250-300 g) wurden mit Testosteron-Propionat (Halbwertszeit = 4 Tage) in einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht vorbehandelt. Als Solvens dienten Rizinusöl und Benzylbenzoat in einem Mischungsverhältnis von 4:1. Die Tiere bekamen für sieben Tage einmal täglich zwischen 15 und 17 Uhr eine subkutane Injektion in die Nackenfalte. Während der Vorbehandlungsperiode wurde der Gewichtsverlauf erfasst. Darauf folgte die Isolierung der proximalen Tubuluszellen am achten Tag. Schließlich wurde die gewonnene Zellsuspension mit 10 µl ³H-Taurocholat im Wasserbad für 10 Minuten inkubiert.

Ergebnisse:

Wie in der Abb. 16 gezeigt, bestand kein signifikanter Unterschied in der ³H- Taurocholat-Aufnahme der Tubuluszellen nach Vorbehandlung mit Testosteron-Propionat (p>0,05) gegenüber den Kontrolltieren. Die Daten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Akkumulationsfaktoren		
	Kontrolle Weiblich	Weiblich + Testosteron
MW	3,68	3,98
SEM	0,43	0,5
n	8	9
p	> 0,05	

Tab. 2 : Einfluss von Testosteron-Propionat auf die renal tubuläre ³H-Taurocholat-Aufnahme weiblicher Sprague-Dawley Ratten. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ³H-Taurocholat-Konzentration zur ³H-Taurocholat-Konzentration in der Badlösung dar.

³H-Taurocholat-
Akkumulationsfaktor

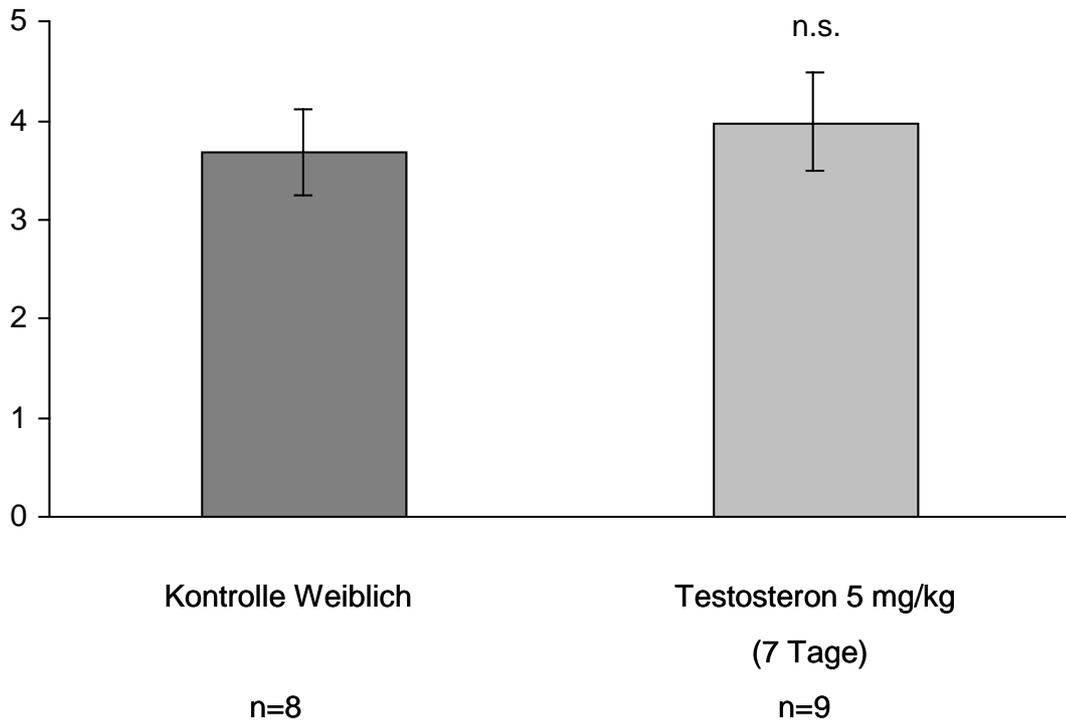


Abb. 16 : Graphische Darstellung der ³H-Taurocholat-Akkumulationsfaktoren weiblicher Ratten nach Vorbehandlung mit Testosteron (MW±SEM). Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Testosteron auf den renalen Taurocholattransport.
n.s.: nicht signifikant, p>0,05

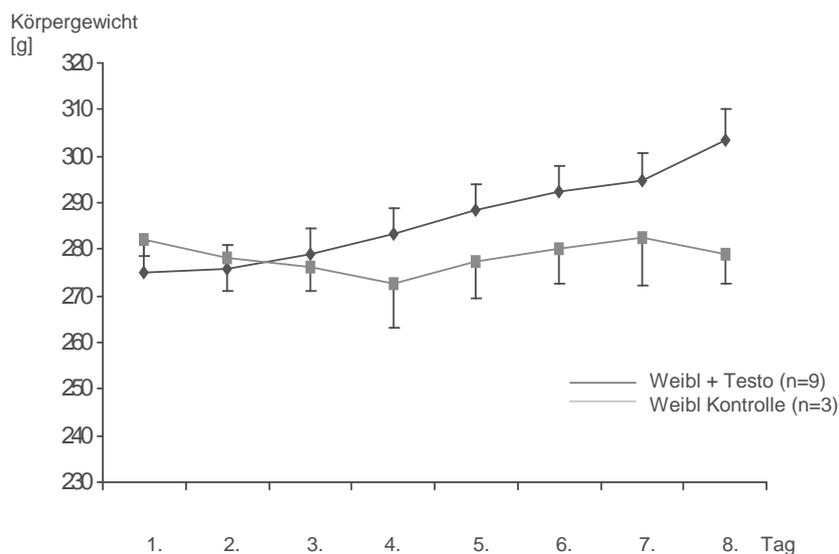


Abb. 17 : Graphische Darstellung des Gewichtsverlaufes (MW±SEM) der weiblichen Sprague-Dawley Ratten, welche mit Testosteron-Propionat nach dem oben beschriebenen Spritzprotokoll behandelt wurden (Vorbehandlungsperiode: 7 Tage; Experiment: 8. Tag), gegenüber weiblichen Kontrolltieren.

3.2.3 Einfluss von Estradiol auf den renalen Taurocholattransport männlicher Ratten

Versuchsablauf:

Es wurde eine Vorbehandlung männlicher Ratten mit Ethinyl-Estradiol in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht für vier Tage durchgeführt. Das Hormon wurde in Rizinusöl und Benzylbenzoat (Mischungsverhältnis 4:1) gelöst. Die Injektionen wurden einmal täglich zwischen 15 und 17 Uhr in die Nackenfalte der Tiere verabreicht. Während dieser Periode wurde der Gewichtsverlauf erfasst. Darauf folgte die Durchführung der Zellisolierung am fünften Tag. Einer anderen Gruppe wurde eine 1:100 Verdünnung dieser Ethinyl-Estradiol-Lösung gespritzt (50 µg/kg). Desweiteren wurde eine dritte Gruppe von Tieren mit Ethinyl-Estradiol (5 mg/kg) für einen längeren Zeitraum (zehn bis zwölf Tage) behandelt. Schließlich wurden die proximalen Tubuluszellen isoliert und die gewonnene Zellsuspension wurde mit 10 µl ³H-Taurocholat im Wasserbad für 10 Minuten inkubiert.

Ergebnisse:

Der ³H-Taurocholatakkuumulationsfaktor wurde bei dieser Vorbehandlung der männlichen Tiere in allen drei Gruppen gegenüber den Kontrollratten signifikant beeinflusst. Dabei ergaben sich folgende Werte: Bei Behandlung mit 5 mg/kg Körpergewicht Ethinyl-Estradiol sank der Taurocholat-Akkumulationsfaktor von $5,63 \pm 0,88$ (n=10) auf $2,17 \pm 0,35$ (n=8). Bei den Tieren, die mit der Dosis 50 µg/kg Körpergewicht vorbehandelt worden sind, fiel der Akkuumulationsfaktor auf $2,16 \pm 0,72$ (n=6) ab. Nach Langzeitbehandlung für 10-12 Tage lag der Akkuumulationsfaktor sogar bei einem Wert von $1,13 \pm 0,15$ (n=4). Die Werte unterschieden sich in allen drei Gruppen hoch signifikant gegenüber männlichen Kontrolltieren (p<0,001).

Akkumulationsfaktoren				
	Kontrolle Männlich	Ethinyl-Estradiol 5 mg/kg (4 Tage)	Ethinyl-Estradiol 50 µg/kg (4 Tage)	Ethinyl-Estradiol 5 mg/kg (10-12 Tage)
MW	5,63	2,17	2,16	1,13
SEM	0,28	0,12	0,29	0,07
n	10	8	6	4
p		< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tab. 3 : Einfluss von Ethinyl-Estradiol auf die renale ³H-Taurocholat-Aufnahme im proximalen Tubulus bei männlichen Sprague-Dawley Ratten gegenüber Kontrolltieren. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ³H-Taurocholat-Konzentration zur ³H-Taurocholat-Konzentration in der Badlösung dar.

³H-Taurocholat-
Akkumulationsfaktor

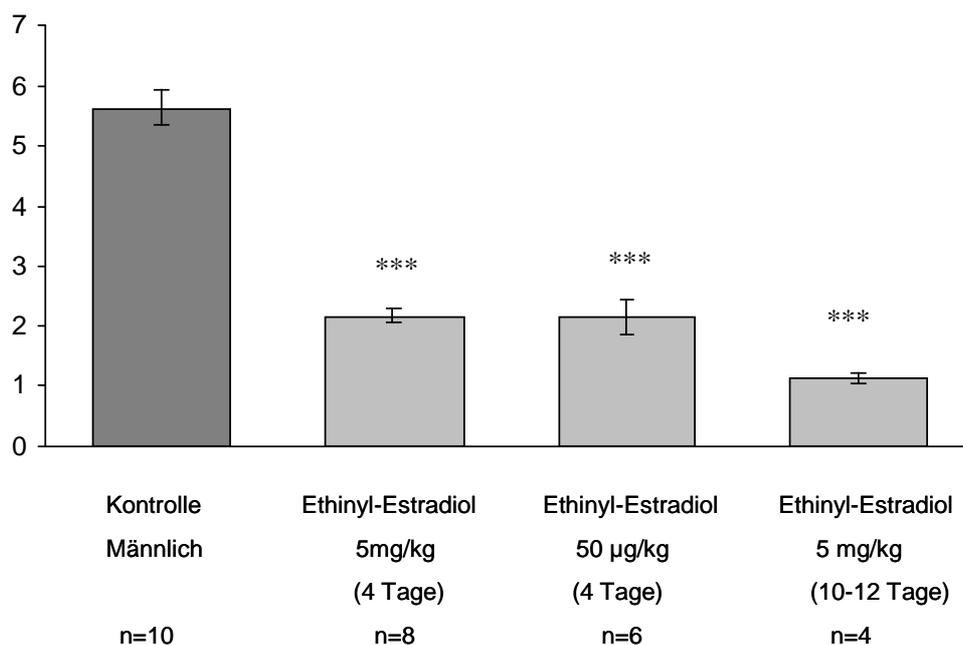


Abb. 18 : Graphische Darstellung der ³H-Taurocholat-Akkumulationsfaktoren männlicher Tiere nach Vorbehandlung mit Ethinyl-Estradiol (MW±SEM). Sogar bei einer niedrigen Dosierung des Hormons von 50 µg/kg sank der Taurocholat-Akkumulationsfaktor signifikant um 61 %. Dieser Effekt konnte durch eine Dosis von 5 mg/kg Ethinyl-Estradiol bzw. eine längere Vorbehandlungsperiode nicht signifikant gesteigert werden.

***: p<0,001

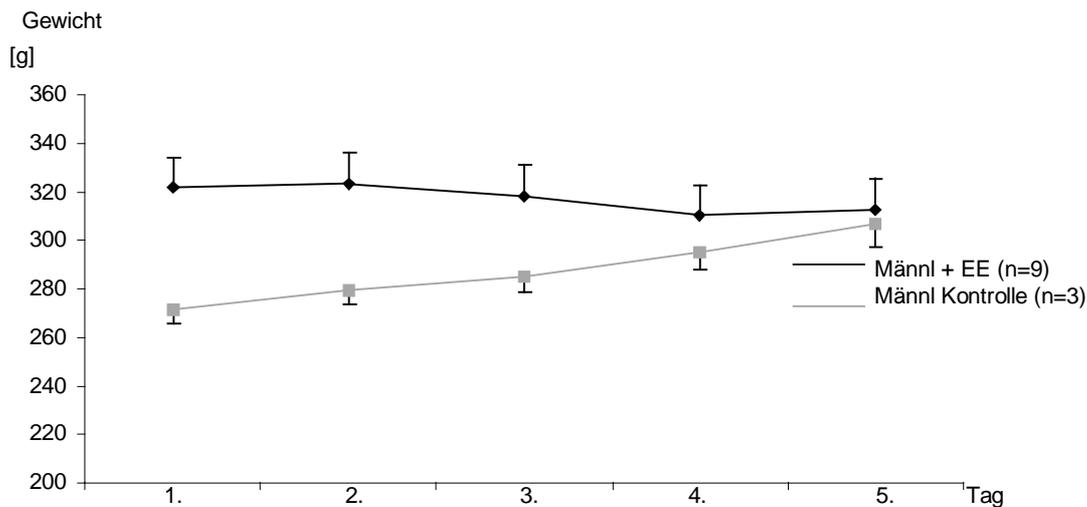


Abb. 19 : Graphische Darstellung des Gewichtsverlaufes der mit Ethinyl-Estradiol behandelten männlichen Ratten gegenüber Kontrolltieren (MW \pm SEM).

3.2.4 Einfluss des Antiöstrogens ICI 182780 auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten

Versuchsablauf:

Es wurden weibliche Ratten mit dem Antiöstrogen ICI 182780 (Faslodex), welches in Rizinusöl und Benzylbenzoat (4:1) gelöst wurde, mit einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht vorbehandelt. Die Substanz wurde einmal täglich für vier Tage subkutan in die Nackenfalte appliziert. Eine weitere Gruppe wurde mit der doppelten Dosis (1 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Darauf wurde dann die Isolierung der proximalen Tubuluszellen am fünften Tag durchgeführt und die gewonnene Zellsuspension mit 10 μ l 3 H-Taurocholat im Wasserbad für 10 Minuten inkubiert.

Ergebnisse:

Die oben beschriebene Vorbehandlung hatte keinen Effekt auf den Taurocholattransport in der Niere weiblicher Ratten (n.s., $p > 0,05$). Auch nach Verdopplung der Behandlungsdosis zeigte sich kein Effekt. Die einzelnen Werte sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Akkumulationsfaktoren			
	Kontrolle Weiblich	ICI 0,5 mg/kg (4 Tage)	ICI 1,0 mg/kg (4 Tage)
MW	3,68	3,34	3,27
SEM	0,43	0,46	0,3
n	8	6	3
p		> 0,05	> 0,05

Tab. 4 : Einfluss des Antiestrogens ICI 182780 (Faslodex) auf den renal tubulären ³H-Taurocholat-Transport weiblicher Sprague-Dawley Ratten gegenüber Kontrolltieren. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ³H-Taurocholat-Konzentration zur ³H-Taurocholat-Konzentration in der Badlösung dar.

³H-Taurocholat-
Akkumulationsfaktor

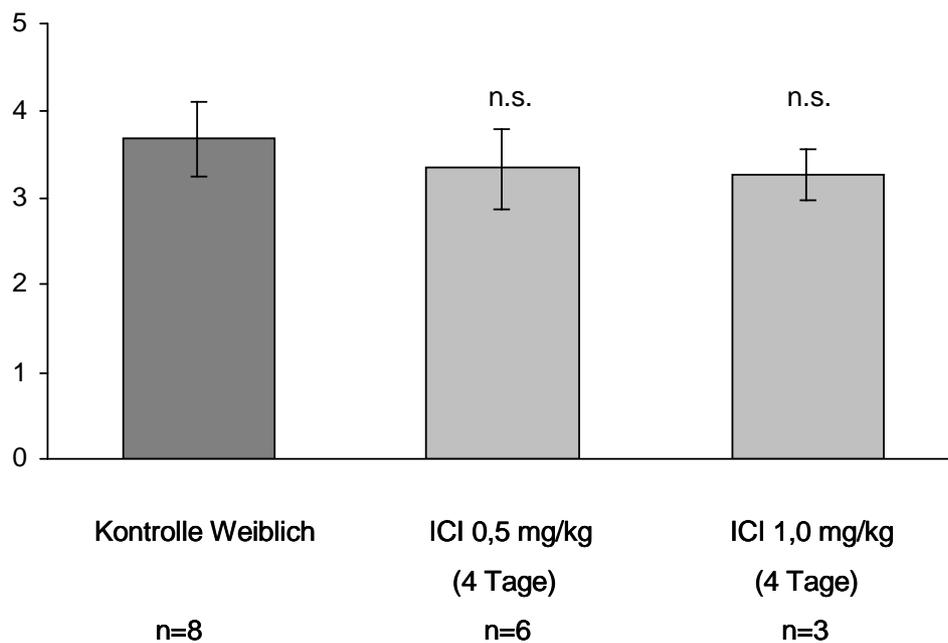


Abb. 20 : Graphische Darstellung der ³H-Taurocholat-Akkumulationsfaktoren (MW±SEM). Bei beiden Konzentrationen ließ sich kein Effekt des Antiestrogens auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten feststellen.
n.s.: nicht signifikant, p>0,05

3.2.5 Einfluss des GnRH-Analogons Buserelin auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten

Versuchsablauf:

Nach Beladung von osmotischen Minipumpen (Alzet®) mit Buserelin gelöst in Wasser (800 µg/200 µl Wasser), wurde das Pumpensystem chirurgisch subkutan auf dem Rücken der weiblichen Tiere implantiert. Auf diese Weise erfolgte die Vorbehandlung der Ratten für vier Wochen (28 Tage). Darauf wurden die proximalen Tubuluszellen frisch isoliert und die gewonnene Zellsuspension mit 10 µl ³H-Taurocholat für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert.

Ergebnisse:

Der renale Taurocholattransport der auf diese Art vorbehandelten Tiere (n=4) wies keinen signifikanten Unterschied gegenüber weiblichen Kontrollratten auf (p>0,05). Die ermittelten Daten sind der Wertetabelle 5 zu entnehmen.

Akkumulationsfaktoren		
	Kontrolle Weiblich	Buserelin (Minipumpe, 28 Tage)
MW	3,68	3,94
SEM	0,43	0,56
n	8	4
p	> 0,05	

Tab. 5 : Einfluss des GnRH-Analogons Buserelin auf die renal tubuläre ³H-Taurocholat-Aufnahme weiblicher Sprague-Dawley Ratten gegenüber einer Kontrollgruppe. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ³H-Taurocholat-Konzentration zur ³H-Taurocholat-Konzentration in der Badlösung dar.

³H-Taurocholat- Akkumulationsfaktor

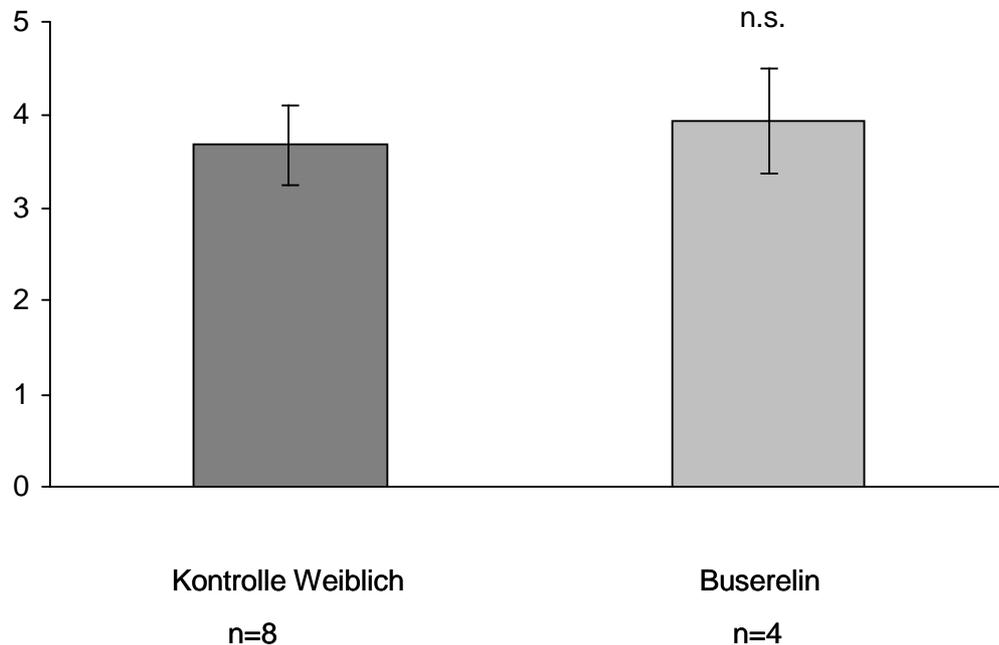


Abb. 21 : Graphische Darstellung der ³H-Taurocholatakumulationsfaktoren (MW±SEM) weiblicher Ratten. Der Taurocholattransport der proximalen Tubuluszellen wurde nicht signifikant durch die „chemische Kastration“ mittels eines GnRH-Analogons beeinflusst. n.s.: nicht signifikant, p>0,05

3.2.6 Einfluss von chirurgischer Ovariectomie auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten

Versuchsablauf:

Die Experimente begannen mit der Durchführung einer Ovariectomie. Nach einer Erholungszeit von zwei bis vier Wochen wurden die proximalen Tubuluszellen isoliert und die gewonnene Zellsuspension mit 10 µl ³H-Taurocholat im Wasserbad für 10 Minuten inkubiert.

Ergebnisse:

Der Akkumulationsfaktor der Tubuluszellen weiblicher gonadektomierter Ratten (n=8) wurde nicht signifikant gegenüber Kontrolltieren beeinflusst. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle 6 zu sehen.

Akkumulationsfaktoren		
	Kontrolle Weiblich	Chirurgische Ovarektomie
MW	3,68	3,67
SEM	0,43	0,29
n	8	8
p	> 0,05	

Tab. 6 : Einfluss einer chirurgischen Ovarektomie auf die renal tubuläre ^3H -Taurocholat-Aufnahme weiblicher Sprague-Dawley Ratten gegenüber einer Kontrollgruppe. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ^3H -Taurocholat-Konzentration zur ^3H -Taurocholat-Konzentration in der Badlösung dar.

^3H -Taurocholat-
Akkumulationsfaktor

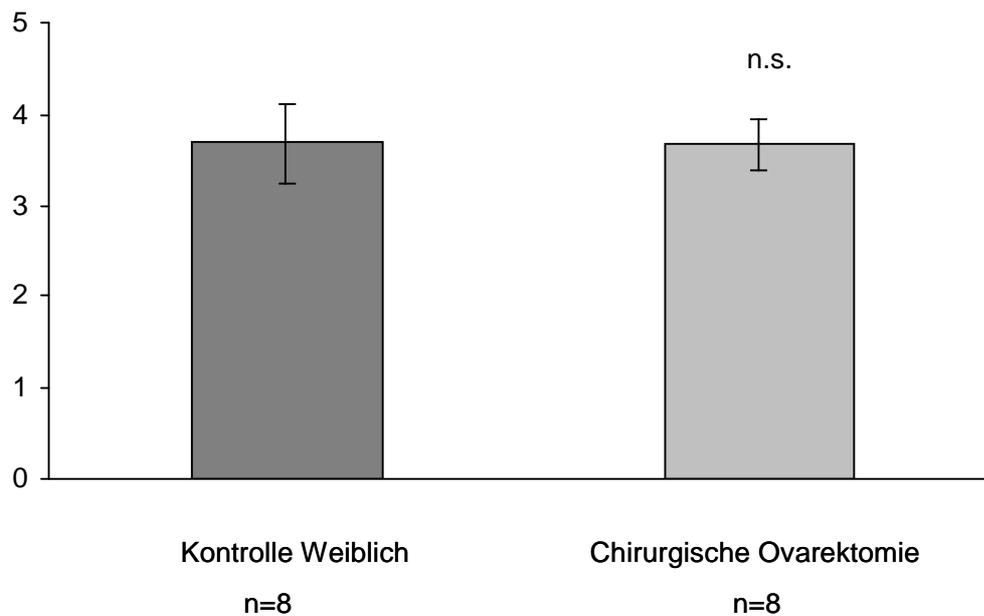


Abb. 22 : Graphische Darstellung der ^3H -Taurocholat-Akkumulationsfaktoren weiblicher Tiere nach chirurgischer Ovarektomie ($\text{MW} \pm \text{SEM}$). Der Taurocholattransport der proximalen Tubuluszellen wurde nicht signifikant beeinflusst.
n.s.: nicht signifikant, $p > 0,05$

3.2.7 Einfluss von Ovariectomie und nachfolgender Estrogen-Behandlung auf den renalen Taurocholattransport weiblicher Ratten

Versuchsablauf:

Nach Durchführung einer Ovariectomie und einer Erholungszeit der Tiere von zwei bis vier Wochen, wurden diese mit Ethinyl-Estradiol in einer Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht vorbehandelt. Die Injektion des Hormons wurde einmal täglich subkutan für vier Tage durchgeführt. Einer weiteren Gruppe wurde nach dem chirurgischen Eingriff eine Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht injiziert.

Ergebnisse:

Die Akkumulationsfaktoren der mit „physiologischer Dosis“ Ethinyl-Estradiol behandelten Ratten (n=5) erreichten keine statistische Signifikanz gegenüber unbehandelten ovariectomierten Ratten. Dagegen sich bei den Ratten bei Behandlung mit einer „pharmakologischen Dosis“ Ethinyl-Estradiol eine signifikante Senkung der intrazellulären Gallensäureaufnahme (n=4). Die einzelnen Daten sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Akkumulationsfaktoren			
	Weiblich Kontrolle Ovariectomie	Ovariectomie + Ethinyl-Estradiol 50 µg/kg (4 Tage)	Ovariectomie + Ethinyl-Estradiol 5 mg/kg (4 Tage)
MW	3,67	4,12	1,70
SEM	0,29	0,54	0,29
n	8	5	4
p		>0,05	< 0,05

Tab. 7 : Einfluss von Ethinyl-Estradiol auf die renal tubuläre ³H-Taurocholat-Aufnahme weiblicher ovariectomierter Sprague-Dawley Ratten gegenüber einer Kontrollgruppe. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ³H-Taurocholat-Konzentration zur ³H-Taurocholat-Konzentration in der Badlösung dar.

³H-Taurocholat-
Akkumulationsfaktor

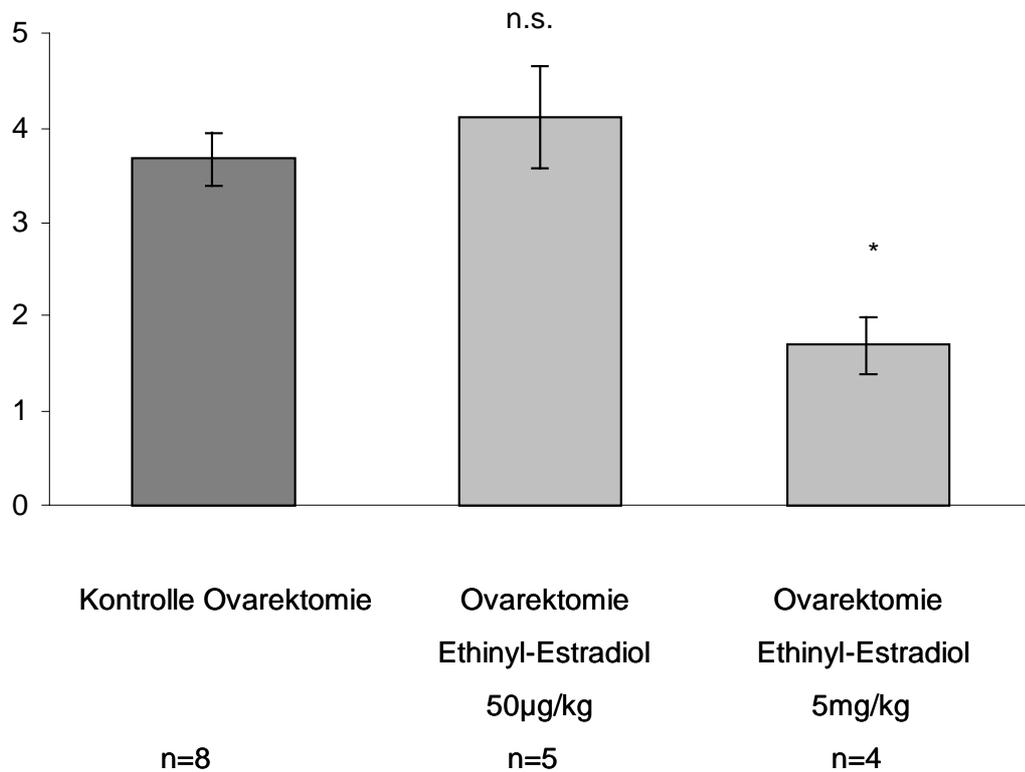


Abb. 23 : Graphische Darstellung der ³H-Taurocholat-Akkumulationsfaktoren weiblicher Tiere nach durchgeführter Ovarektomie und nachfolgender Applikation von Ethinyl-Estradiol (MW±SEM). In einer Dosierung von 50 µg/kg wurde der renale Taurocholattransport nicht signifikant beeinflusst. Allerdings wurde mit einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht Ethinyl-Estradiol - wie bei männlichen Ratten - die Taurocholatakumulation proximaler Tubuluszellen ovariectomierter Ratten signifikant um 54 % gesenkt.

n.s.: nicht signifikant, p>0,05

* : p<0,05

3.2.8 Bestimmung von Estradiol im Serum vorbehandelter männlicher Ratten

Versuchsablauf:

Nach vollzogener Blutabnahme wurde mittels Zentrifugation Serum gewonnen. Die Bestimmung des Hormons erfolgte mit freundlicher Hilfe des „Institutes für Klinische Chemie“ der RWTH-Aachen.

Ergebnisse:

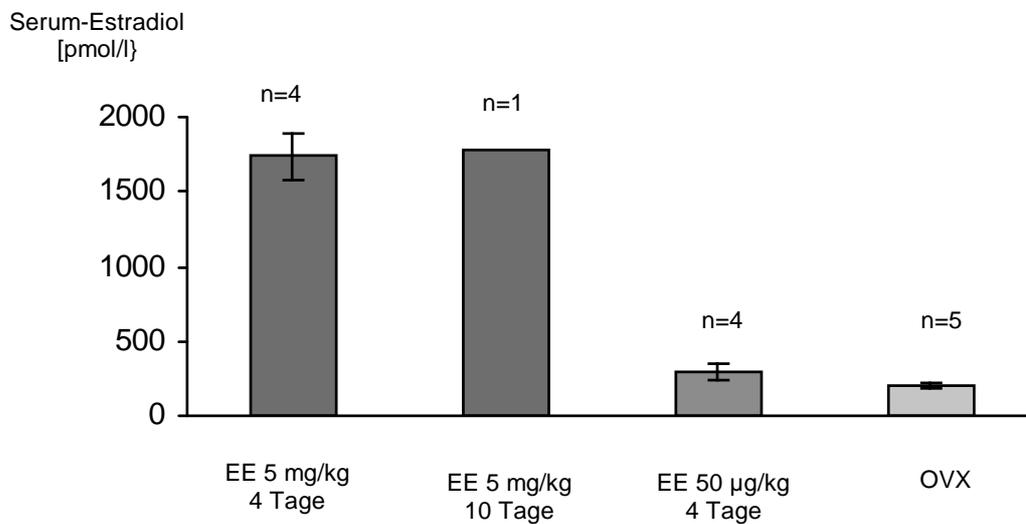


Abb. 24 : Graphische Darstellung der ermittelten Serum-Konzentrationen von Estradiol (MW±SEM) bei männlichen Ratten nach Verabreichung von Ethinyl-Estradiol (EE) in einer Dosierung von 5 mg/kg bzw. 50 µg/kg über 4 Tage gegenüber weiblichen ovariectomierten Tieren (OVX). Desweiteren ist zusätzlich bei einem Tier der Wert nach 10 Tagen Vorbehandlung bestimmt worden.

3.2.9 Clearance-Experimente

3.2.9.1 Vorbemerkungen

Da es sich bei den nachfolgend dargestellten Clearance-Versuchen um den Vergleich zweier unabhängiger Versuchsgruppen handelte, wurde hier der unverbundene Student's t-Test zur statistischen Analyse verwendet.

3.2.9.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Taurochololclearance

Versuchsablauf:

Durchführung des Versuches wie im Methodikteil beschrieben.

Ergebnisse:

³H-Taurocholol-Clearance [$\mu\text{l}/(\text{min} \times 100\text{g KG})$]		
	Kontrolle Männlich	Kontrolle Weiblich
MW	133,9	262,0
SEM	28,1	45,4
n	5	4
p	< 0,05	

Tab. 8 : Einfluss des Geschlechtes von Sprague-Dawley Ratten auf die ³H-Taurocholol-Clearance. Diese ist als dasjenige Plasmavolumen definiert, dass pro Zeiteinheit von der radioaktiv markierten Gallensäure „geklärt“ wird. Das Taurocholol wird somit schließlich im Urin ausgeschieden.

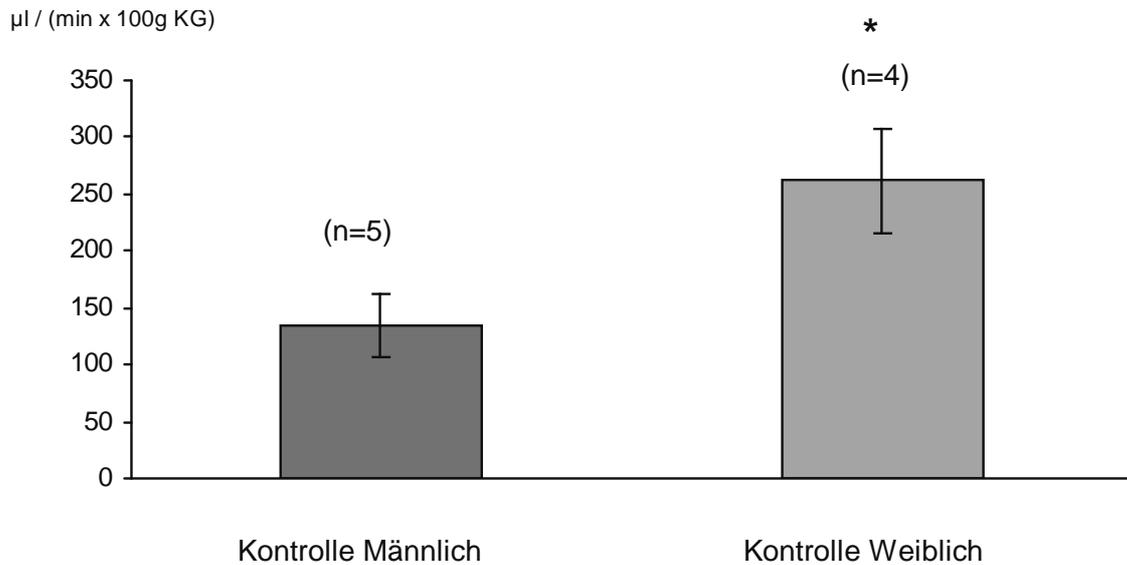


Abb. 25 : Graphische Darstellung der ^3H -Taurocholat-Clearance männlicher und weiblicher Ratten ($\text{MW} \pm \text{SEM}$). Diese war bei weiblichen Tieren signifikant höher als bei den männlichen Ratten.

*: $p < 0,05$

3.2.10 Bestimmung der Gallensäuren

Versuchsablauf:

Die Gallensäuren wurden mit einem kommerziellen Kit („Merckotest®“) bestimmt, wobei eine enzymatische Farbreaktion photometrisch quantifiziert wurde. Die ausführliche Beschreibung des Tests ist dem Methodikteil zu entnehmen (Abschnitt 2.7).

Ergebnisse:

Die Ergebnisse ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) sind der Tab. 9 zu entnehmen.

Gallensäuren-Konzentration im Serum [$\mu\text{mol/l}$]					
	Kontrolle Männlich	Ethinyl- Estradiol 50 $\mu\text{g/kg}$ 4 Tage	Ethinyl- Estradiol 5 mg/kg 4 Tage	Ethinyl- Estradiol 5 mg/kg 10 Tage	4 Tage nach Ligatur des Gallengangs
MW	13,97	8,56	18,26	95,12	768,88
SEM	4,25	4,78	4,28	54,92	119,28
n	7	3	4	3	4

Tab. 9 : Die Gallensäuren-Konzentration im Serum von mit Ethinyl-Estradiol vorbehandelten männlichen Ratten wurden bestimmt, um möglicherweise auftretende Effekte durch eine hormonell induzierte Cholestase auszuschließen. Auch nach zehn Tagen Vorbehandlung lag die Serumkonzentration um ein Vielfaches niedriger als nach chirurgisch induzierter Cholestase mittels Ligatur des Ductus choledochus.

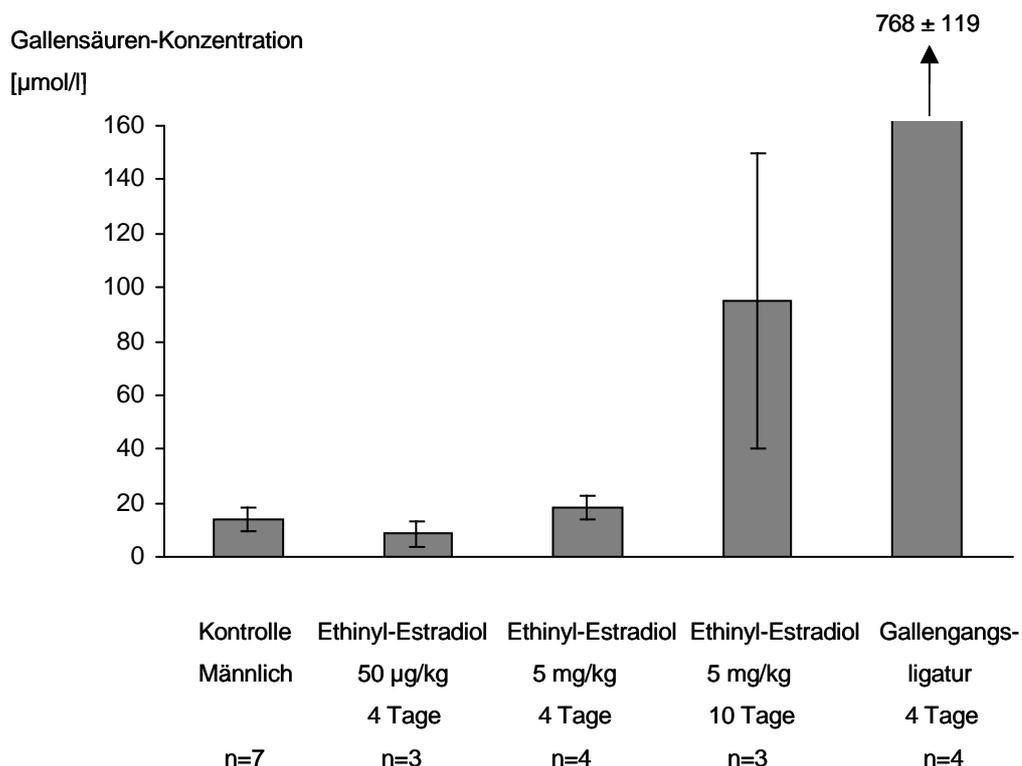


Abb. 26 : Graphische Darstellung der Daten aus Tab. 9 (MW \pm SEM). Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten 4 Tage nach Ligatur des Ductus choledochus bei männlichen Ratten eine massive Cholestase. Durch die Gabe von Ethinyl-Estradiol zeigte sich dagegen nach 4 Tagen keine deutliche Erhöhung der Serum-Konzentration an Gallensäuren, wie in der Gegenüberstellung mit männlichen Kontrolltieren zu sehen ist.

3.2.11 Western Blot-Experimente

Versuchsablauf:

Nach Isolierung der proximalen Tubuluszellen männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten wurden Western Blots durchgeführt. Die genaue Durchführung ist dem Kapitel 2 zu entnehmen.

Ergebnisse:

Es wurden mehrere Western Blot-Analysen durchgeführt. Die folgende Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

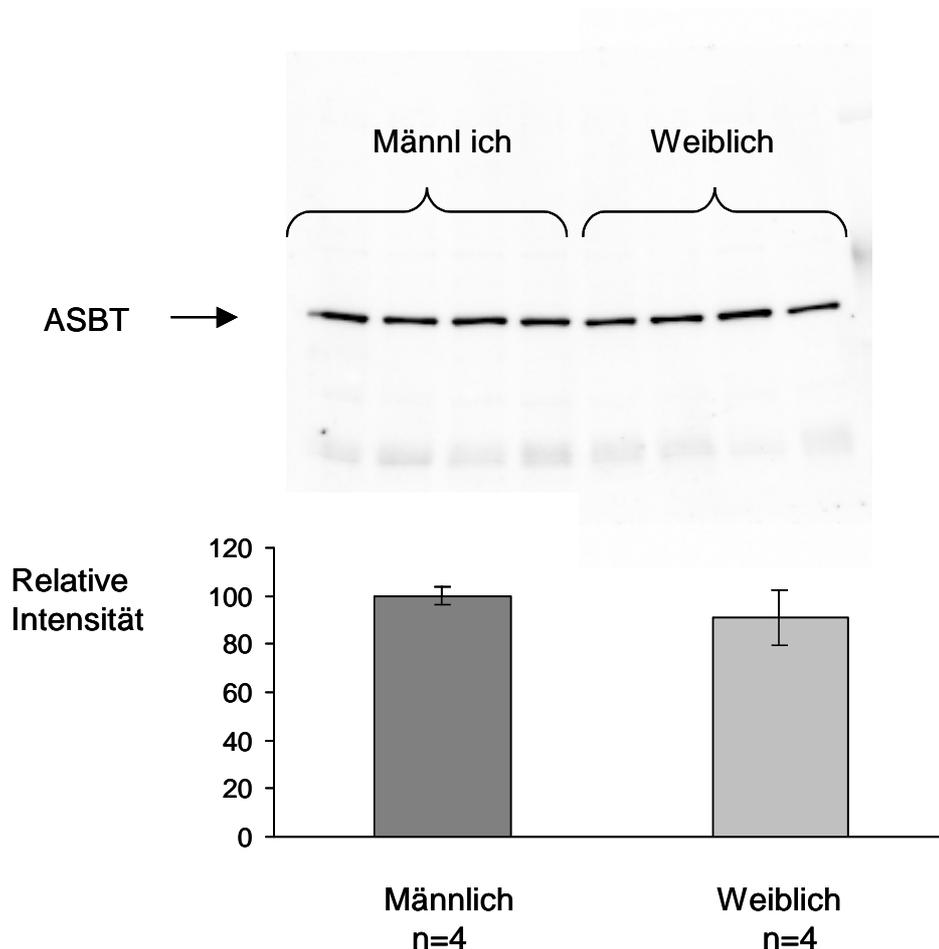


Abb. 27 : Repräsentativer Western Blot. Darstellung der Proteinmenge an ASBT in frisch isolierten Tubuluszellen von männlichen (n=4) und weiblichen (n=4) Sprague-Dawley Ratten. Die Geltaschen wurden alle jeweils mit derselben Proteinmenge beladen. Im unteren Abschnitt der Abbildung ist die relative Intensität der geschlechtsspezifischen Proteinmenge nach densitometrischer Auswertung dargestellt.

3.3 Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf den renal tubulären Taurocholattransport

3.3.1 Vorbemerkungen

Da es sich bei den nachfolgend dargestellten Aufnahmestudien frisch isolierter proximaler Tubuluszellen und Clearance-Versuchen um den Vergleich zweier unabhängiger Versuchsgruppen handelte, wurde hier der unverbundene Student's t-Test zur statistischen Analyse verwendet.

3.3.2 Aufnahmestudien an frisch isolierten proximalen Tubuluszellen

Versuchsablauf:

Zur Eliminierung endogener Glukokortikoide wurde bei männlichen Sprague-Dawley Ratten mit Körpergewichten von 300-340 g eine chirurgische Adrenalektomie durchgeführt. Danach bekamen die Tiere 0,9 % NaCl-Lösung anstatt Leitungswasser, um Salzverlusten durch die nun fehlenden Mineralokortikoide vorzubeugen. Nach einer Erholungszeit der Tiere von 1-2 Wochen wurden die Ratten für 2,5 Tage mit Dexamethason (Halbwertszeit = 3,5 Tage) in einer Dosis von 60 µg/100g Körpergewicht vorbehandelt. Als Lösungsmittel für das Glukokortikoid diente PBS (Phosphate-Buffer-Solution). Die Injektionen wurden zweimal täglich subkutan um 0900 und 1700 Uhr verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt nur das PBS verabreicht. Schließlich folgte die Isolierung der proximalen Tubuluszellen am dritten Tag der Behandlung nach morgendlicher Injektion des Steroidhormons. Darüber hinaus wurde bei einigen Ratten die Serum-Konzentration von Aldosteron bestimmt, um den Erfolg der Adrenalektomie zu überprüfen (Institut für Klinische Chemie, RWTH-Aachen).

Ergebnisse:

Der Taurocholat-Akkumulationsfaktor lag bei den mit Dexamethason vorbehandelten Tieren bei $4,89 \pm 0,53$ (MW \pm SEM) und bei der mit PBS gespritzten Kontrollgruppe bei $3,84 \pm 0,59$. Bei der statistischen Testung im unverbundenen Student's t-Test ergab sich ein $p > 0,05$. Somit lag keine Signifikanz der Ergebnisse vor. Die vollständigen Daten sind in Tab. 10 zu sehen.

Akkumulationsfaktoren		
	Adrenalectomie Dexamethason (2,5 Tage)	Adrenalectomie Kontrolle (2,5 Tage)
MW	4,89	3,84
SEM	0,53	0,59
n	11	8
p	> 0,05	

Tab. 10 : Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf den renal tubulären ^3H -Taurocholattransport männlicher adrenalectomierter Sprague-Dawley Ratten. Der Akkumulationsfaktor stellt das Verhältnis der zellulären ^3H -Taurocholattransportkonzentration zur ^3H -Taurocholattransportkonzentration in der Badlösung dar.

^3H -Taurocholattransport-
Akkumulationsfaktor

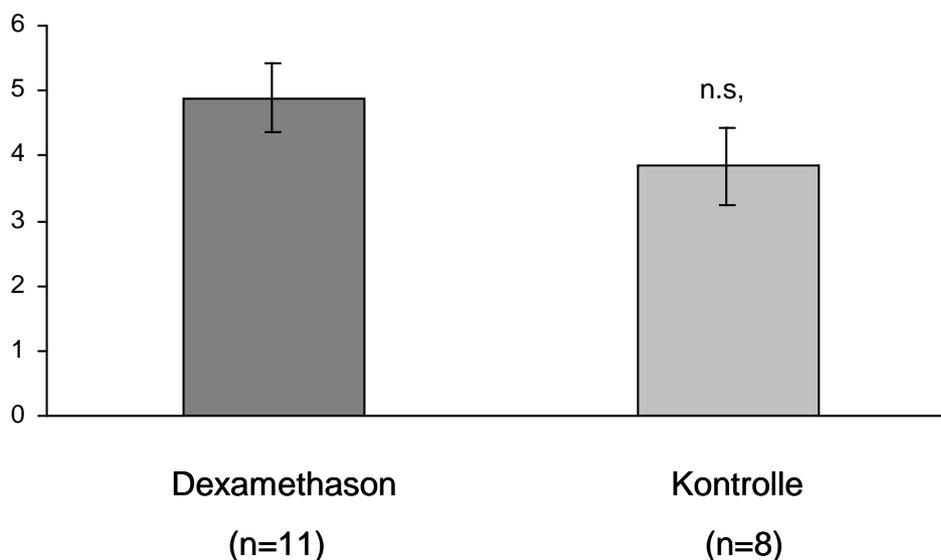


Abb. 28 : Graphische Darstellung der Werte aus Tab. 10 (MW \pm SEM). Der renal tubuläre Taurocholattransport männlicher adrenalectomierter Sprague-Dawley Ratten ließ sich durch die Gabe von Dexamethason gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflussen. n.s.: nicht signifikant, $p > 0,05$

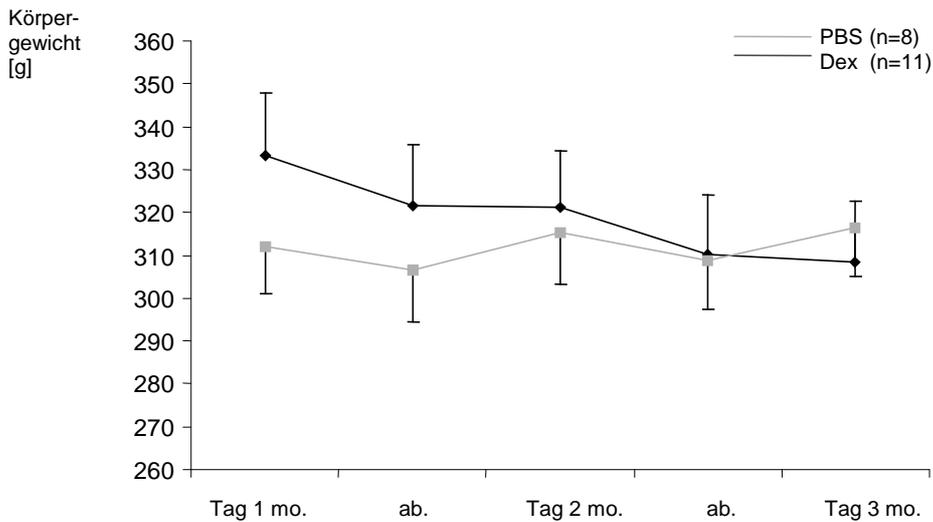


Abb. 29 : Erfassung des Gewichtsverlaufes männlicher adrenalectomierter Sprague-Dawley Ratten während der Vorbehandlungsperiode mit Dexamethason gegenüber Kontrolltieren, die Phosphatpuffer-Lösung (PBS) erhielten (MW±SEM). Während das Gewicht bei den Kontrolltieren nahezu konstant blieb, war bei den mit Dexamethason behandelten Ratten ein stetiger Abfall des Körpergewichtes zu erkennen.

Aldosteron-Konzentration

im Serum [nmol/l]

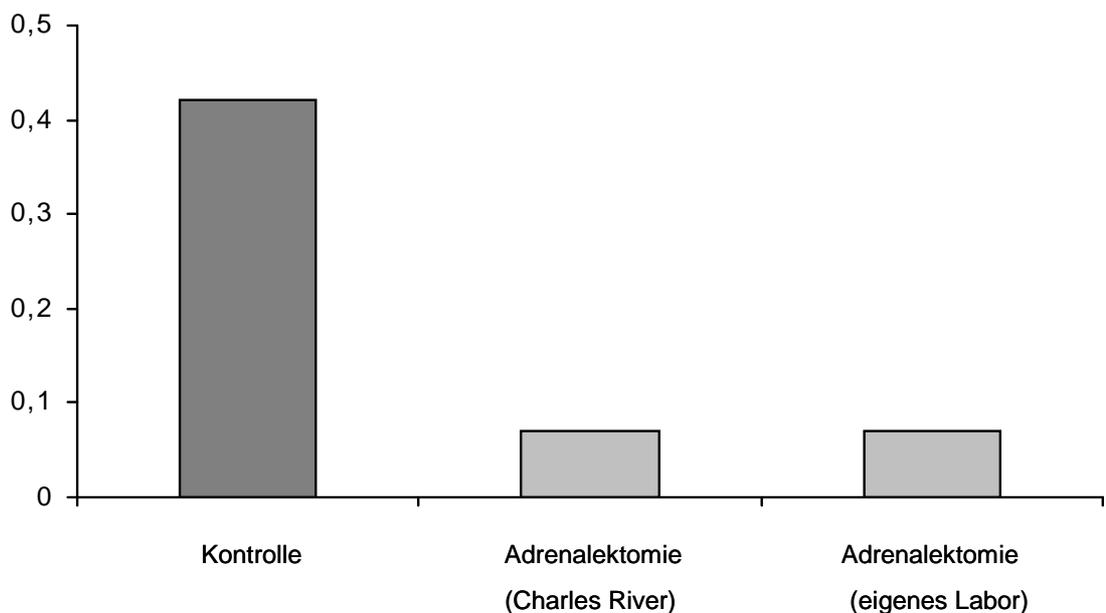


Abb. 30 : Bestimmung der Serum-Konzentration von Aldosteron bei männlichen Sprague-Dawley Ratten nach einer durchgeführten Adrenalectomie von der Firma „Charles-River“ gegenüber einer selbst durchgeführten Operation und einem Kontrolltier. Bei beiden adrenalectomierten Tieren lag die Konzentration des Aldosterons im Serum an der unteren Nachweisgrenze des Testkits. Die angegebenen Werte wurden an jeweils einem Tier bestimmt.

3.3.3 Clearance-Experimente

Versuchsablauf:

Durchführung der Versuche wie im Methodikteil beschrieben.

Ergebnisse:

³ H-Taurocholat-Clearance [$\mu\text{l} / (\text{min} \times 100\text{g KG})$]		
	Adrenalectomie Dexamethason	Adrenalectomie Kontrolle
MW	100,25	66,77
SEM	42,37	28,13
n	5	6
p	> 0,05	

Tab. 11 : Einfluss von Dexamethason auf die ³H-Taurocholat-Clearance männlicher adrenalectomierter Sprague-Dawley Ratten. Diese ist als dasjenige Plasmavolumen definiert, das pro Zeiteinheit von der radioaktiv markierten Gallensäure geklärt wird. Das „geklärte“ Taurocholat wurde somit schließlich im Urin ausgeschieden.

³H-Taurocholat-Clearance

[$\mu\text{l} / (\text{min} \times 100\text{g KG})$]

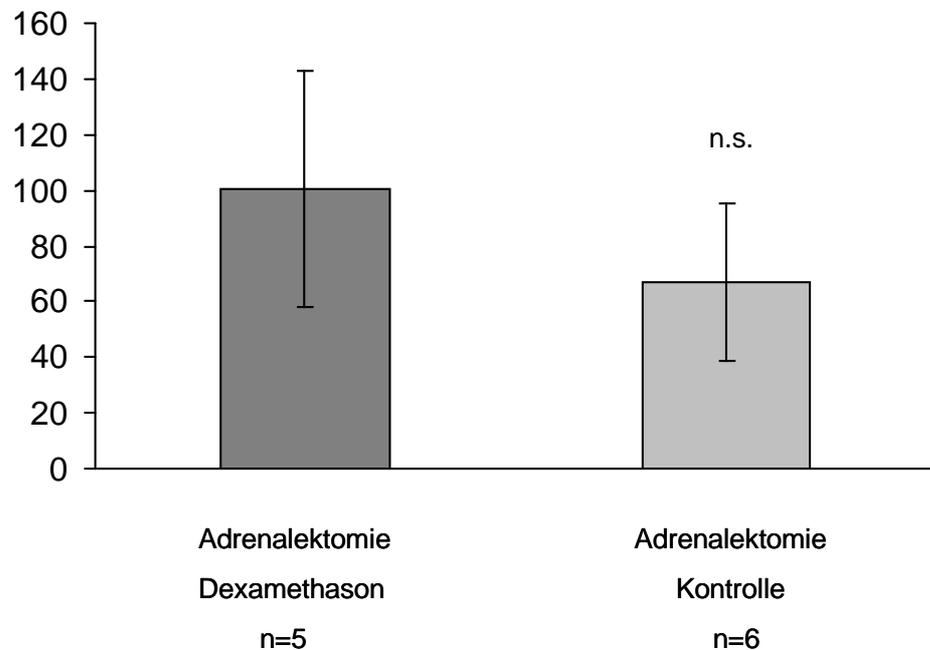


Abb. 31 : Graphische Darstellung der Werte aus Tab. 11 (MW \pm SEM). Die Taurocholat-Clearance wird durch die Vorbehandlung mit Dexamethason nicht signifikant beeinflusst. n.s.: nicht signifikant, p>0,05

3.3.4 Western Blot-Experimente

Versuchsablauf:

Nach Isolierung der proximalen Tubuluszellen wurden Western Blots mit ASBT-Protein von unbehandelten männlichen Kontrolltieren sowie adrenaletomierten Ratten, welche entweder mit Dexamethason oder als Kontrollgruppe mit Phosphatpuffer-Lösung (PBS) vorbehandelt wurden, durchgeführt. Die genaue Durchführung ist dem Kapitel 2 zu entnehmen.

Ergebnisse:

Es wurden mehrere Western Blots durchgeführt. Die beiden folgenden Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse dieser Versuchsreihe dar.

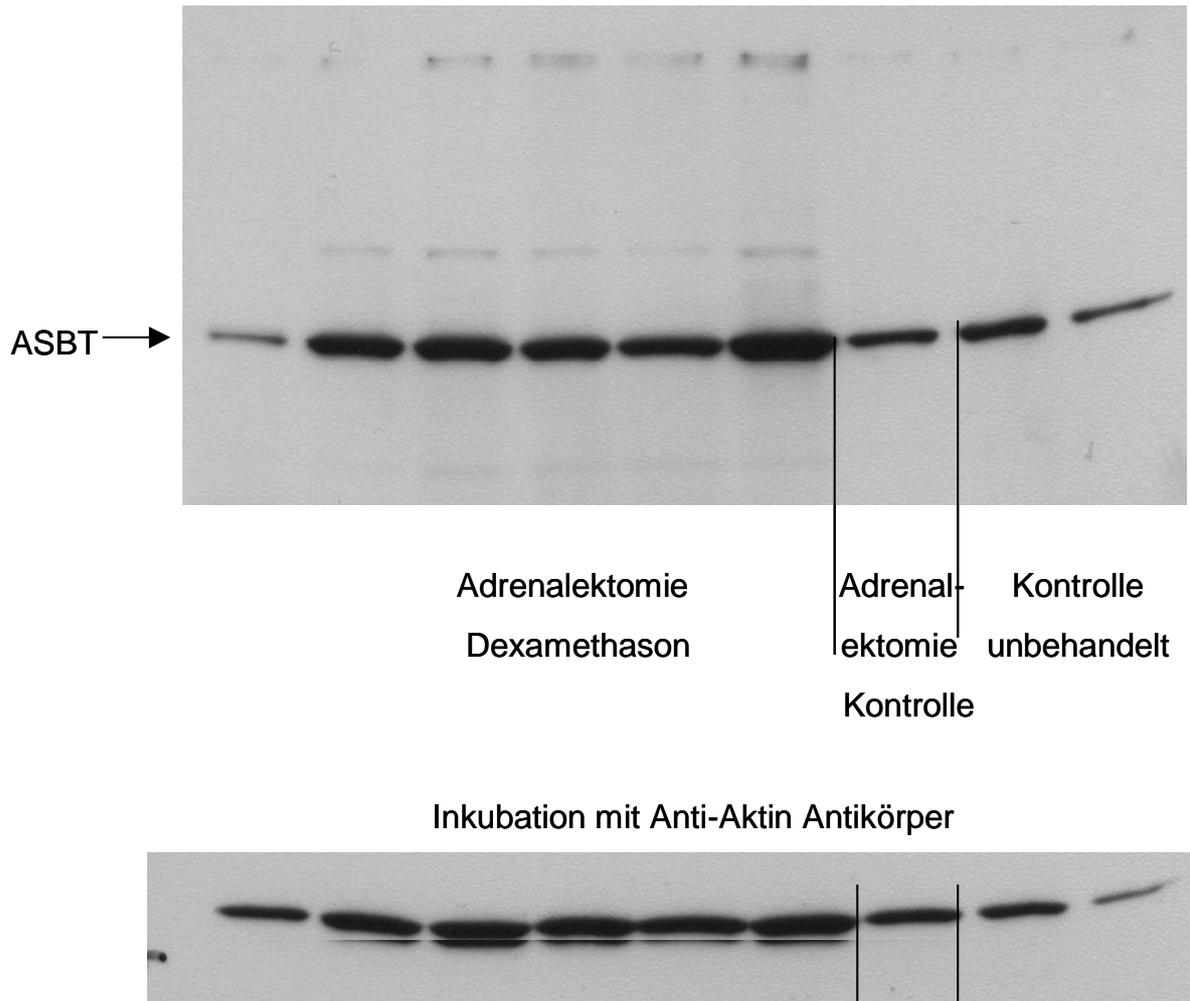


Abb. 32 : Repräsentativer Western Blot (1).

Darstellung der Proteinmenge an ASBT adrenalektomierter Sprague-Dawley Ratten nach Vorbehandlung mit Dexamethason (n=6) gegenüber mit dem Vehikel Phosphatpuffer-Lösung (n=1) vorbehandelten Tieren sowie unbehandelten Kontrolltieren (n=2). Desweiteren sind im unteren Teil Proteinbanden nach Inkubation mit Anti-Aktin-Antikörper zu sehen, welche zur Kontrolle des „Protein-Loads“ dienen. Somit sind die Unterschiede der einzelnen Banden an ASBT-Proteinmenge im oberen Abbildungsteil durch Unterschiede im „Protein-Load“ zu erklären. Es ist zu erwähnen, dass hier eine quantitative Auswertung mittels Densitometrie nicht zur Verfügung stand.

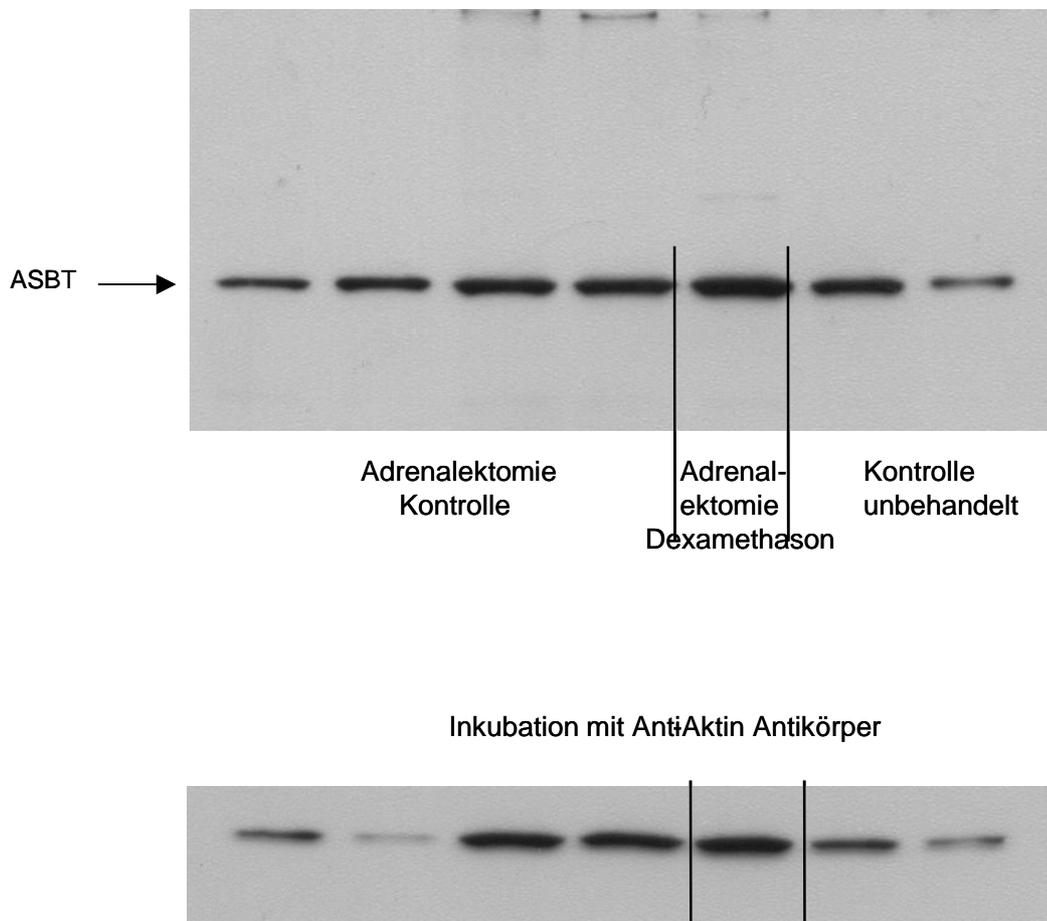


Abb. 33 : *Repräsentativer Western Blot (2).*

Darstellung der Proteinmenge an ASBT adrenalectomierter Sprague-Dawley Ratten nach Vorbehandlung mit Dexamethason (n=1) gegenüber mit dem Vehikel Phosphatpuffer-Lösung (n=4) vorbehandelten Tieren sowie unbehandelten Kontrolltieren (n=2). Desweiteren sind im unteren Teil Proteinbanden nach Inkubation mit Anti-Aktin-Antikörper zu sehen, welche zur Kontrolle des „Protein-Loads“ dienen. Somit sind die Unterschiede der einzelnen Banden an ASBT-Proteinmenge im oberen Abbildungsteil durch Unterschiede im „Protein-Load“ zu erklären. Es ist zu erwähnen, dass hier eine quantitative Auswertung mittels Densitometrie nicht zur Verfügung stand.

4. DISKUSSION

4.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede im renal tubulären Taurocholattransport

Wie schon in der Einleitung erwähnt, gibt es in der Literatur viele Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede bei Transportprozessen. Bei der renalen Sekretion von Paraaminohippurat (PAH) und verschiedener anderer organischer Anionen sind geschlechtsspezifische Unterschiede schon lange bekannt (14, 16, 57, 96). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das erste Mal geschlechtsspezifische Unterschiede im renalen Transport der Gallensäuren.

Die frisch isolierten proximalen Tubuluszellen akkumulierten signifikant radioaktiv markiertes Taurocholat, wie auch in früheren Experimenten gezeigt werden konnte (107, 109, 110). Die Taurocholat-Aufnahme war hier um 35 % niedriger in Zellen von weiblichen Ratten als von männlichen Tieren.

Durch Probenecid konnte in früheren Untersuchungen die Taurocholat-Aufnahme in die proximalen Tubuluszellen nicht beeinflusst werden (110). Dies zeigt, dass die Taurocholat-Aufnahme über die in der basolateralen Zellmembran lokalisierten Anionentransporter, die durch die Substanz gehemmt werden, keine Rolle spielt. Mit S 0960, einem spezifischen Inhibitor des ASBT, konnte dagegen die Taurocholat-Aufnahme nahezu vollständig supprimiert werden (107, 109, 110), so dass man davon ausgehen kann, dass beinahe der gesamte Transport in die Zellen durch den ASBT vermittelt wird.

Der geschlechtsspezifische Unterschied konnte durch die Clearance- Experimente bestätigt werden. So zeigten die weiblichen Tiere eine signifikant höhere Taurocholat-Clearance als die männlichen Tiere. Schlattjan et al. (108) zeigten an diesen Tieren, dass Unterschiede in der Plasmaproteinbindung von Taurocholat, welche die Filtration der Gallensäure und folglich auch die Clearance derselben beeinflussen könnten, sowie die glomeruläre Filtrationsrate keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern aufwiesen. Dieser Befund wird auch durch andere Studien gestützt (78, 96). Somit kann die höhere Taurocholat-Clearance weiblicher Ratten auf eine verminderte Taurocholat-Reabsorption im proximalen Tubulus zurückgeführt werden.

4.2 Effekt des Androgens Testosteron-Propionat auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten

Um die für diesen geschlechtsspezifischen Unterschied verantwortlichen Sexualhormone zu charakterisieren, wurde weiblichen Ratten für sieben Tage Testosteron-Propionat in einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht subkutan injiziert. Bei Untersuchungen des organischen Kationen-Transporters (OCT2) im proximalen Tubulus konnte bei Ratten die Expression des Transporters durch Testosteron in einer Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht beeinflusst werden (72). Trotz einer zehnfach höheren Testosteron-Dosis ließ sich in den Aufnahmestudien kein signifikanter Effekt auf den ASBT feststellen. Der während der Vorbehandlungsperiode festgehaltene Verlauf des Körpergewichtes der Tiere zeigte jedoch deutlich, dass die weiblichen Tiere durch die anabole Wirkung des Sexualhormons rapide an Gewicht zunahmten. Dieser Sachverhalt kann somit als indirekter Hinweis auf eine ausreichende Wirksamkeit des Hormons gewertet werden. Dennoch zeigte sich bei den mit dem Androgen vorbehandelten weiblichen Tieren nur eine milde Tendenz zur höheren Taurocholat-Akkumulation.

4.3 Effekt des Estrogens Ethinyl-Estradiol auf den renal tubulären Taurocholattransport männlicher Ratten

Im nächsten Schritt wurden männliche Tiere mit Ethinyl-Estradiol in derselben Dosierung wie mit Testosteron (5 mg/kg Körpergewicht) vorbehandelt. In einer Untersuchung von Bossard et al. wurden bei mit dieser Dosierung vorbehandelten Ratten in der Leber multiple Veränderungen der Transporteigenschaften der kanalikulären Zellmembran induziert (13). In unseren Untersuchungen zeigte sich eine hoch signifikante Hemmung des Taurocholattransportes um 61 % ($p < 0,001$). Dieser Effekt auf den tubulären Taurocholattransport ließ sich auch nach Vorbehandlung mit einer 100-fach geringeren Dosis Ethinyl-Estradiol (50 µg/kg Körpergewicht) reproduzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass möglicherweise Estrogene für die unterschiedliche Taurocholat-Aufnahme der Geschlechter im proximalen Tubulus verantwortlich sind. Von anderen Autoren konnte bei Northern-Blot Analysen des renalen OATP ebenfalls geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden. Dennoch zeigten sich hier auch nur nach Applikation von Estradiol bei männlichen Ratten signifikante Ergebnisse. Hingegen hatte die Gabe von Testosteron bei weiblichen Ratten keinen signifikanten Effekt (74). Da Estrogene bekanntlich zu einer Cholestase führen können und in der Literatur Ethinyl-Estradiol in der hier verwendeten Dosierung dazu verwendet wurde eine

medikamentöse Cholestase zu induzieren (40), wurden die Gallensäuren im Serum behandelter Tiere bestimmt. Es fanden sich deutlich niedrigere Gallensäuren-Konzentration nach Estrogen-Behandlung als wie nach Ligatur des Gallenganges, so dass cholestatische Effekte auf den ASBT (69, 110) weitgehend ausgeschlossen werden können. Somit kann von einem inhibierendem Effekt der Estrogene auf den Gallensäuren-Transport in der Niere ausgegangen werden.

4.4 Effekt des Antiestrogens ICI 182780 (Faslodex) auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten

Auch der Estrogen-Rezeptor-Antagonist Faslodex (ICI 182780, Review: 52), der in der Therapie des Mammakarzinoms verwendet wird und aufgrund seiner estrogenartigen Struktur als kompetitiver Antagonist am Estrogen-Rezeptor fungiert, hatte keinen Einfluss auf die Taurocholat-Aufnahme in Zellen der weiblichen Tiere. Faslodex wurde in Dosen von 0,5 und 1 mg/kg Körpergewicht eingesetzt, da Faslodex in diesen Dosierungen in einer Studie von Lundeen et al. die trophischen Effekte der Estrogene auf die Gebärmutter sowie die Cholesterin-senkenden Effekte der Estrogene unterdrückte (76).

Aufgrund der fehlenden Wirkung von Faslodex in unseren Versuchen ist eine „klassische“ Rezeptor-vermittelte Wirkung der Estrogene auf den renalen Taurocholattransport unwahrscheinlich.

4.5 Effekt des GnRH-Analogons Buserelin auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten

Darauf folgte die Vorbehandlung weiblicher Ratten mit dem GnRH-Analagon Buserelin, welches beim Mann zur Behandlung des Prostata-Karzinoms eingesetzt wird, um schon auf der Ebene des zentralen Nervensystems (hypothalamisch) durch „medikamentöse Kastration“ die Estrogenwirkung zu antagonisieren. Um konstante Plasma-Spiegel zu erreichen, wurden osmotische Minipumpen verwendet (93), da hierdurch ein hemmender Effekt auf Gonadoliberin-Ausschüttung erreicht wird und somit keine Sexualhormone mehr in den Gonaden produziert werden. Auch diese Behandlung brachte jedoch keinen signifikanten Effekt bezüglich des renalen Taurocholat-Aufnahme. Die Dosis des Buserelins von 24 µg/Tag über 28 Tage lag im oberen Bereich der in der Literatur üblicherweise verwendeten Dosen zur Kastration von Ratten mit GnRH-Agonisten (12-24 µg/Tag für 24-28 Tage, 43, 81, 93, 104).

4.6 Effekt einer chirurgischen Ovariectomie auf den renal tubulären Taurocholattransport weiblicher Ratten

Auch die chirurgische Elimination der endogenen Estrogene mittels Ovariectomie weiblicher Tiere zeigte, ebenso wie die „chemische Kastration“ mit Buserelin, keinen signifikanten Anstieg der renal tubulären Taurocholatakкумуляtion. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Menge der Taurocholat-Aufnahme in proximale Tubuluszellen schon während der Ontogenese bzw. in der Pubertät determiniert wird und diese unterschiedliche Entwicklung der beiden Geschlechter nicht durch einen kurzzeitigen, experimentellen Entzug von Sexualhormonen zu verändern ist. In ähnlicher Weise konnten weder der hepatische – dem ASBT verwandte – Gallensäuretransporter (NTCP, 118) noch der renale organische Anionentransporter (OAT1, 73) in ihrer Transportrate durch eine Ovariectomie gesteigert werden, obwohl durch eine Estrogen-Behandlung ovariectomierter Ratten die Expression beider Transporter vermindert werden konnte (73, 119). Ähnliche Befunde wurden auch von Lu et al. für den renalen OATP beschrieben: sie fanden keinen signifikanten Anstieg der mRNA Expression bei weiblichen Ratten nach Ovariectomie. Durch Gabe von Estradiol konnten sie aber auch wiederum eine moderate Suppression der renalen OATP mRNA-Expression bei weiblichen gonadektomierten Ratten erreichen (74). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Behandlung weiblicher gonadektomierter Tiere mit Ethinyl-Estradiol eine signifikante Inhibition des Gallensäuren-Transportes im proximalen Tubulus der Niere.

4.7 Fazit der geschlechtsspezifischen Regulation des renal tubulären Taurocholattransportes

Die Vermittlung des inhibitorischen Effekts der Estrogene auf den renalen Taurocholattransport ist unklar, so dass genomische und nicht-genomische Mechanismen diskutiert werden müssen. Estrogenrezeptoren wurden sowohl in Nieren von Tieren und Menschen gefunden (Review: 95). In einer Arbeit konnten auch Estrogenrezeptoren im proximalen Tubulus nachgewiesen werden (34). Durch Western-Blot Analysen konnte in der vorliegenden Studie kein Unterschied in der ASBT-Proteinmenge der proximalen Tubuluszellen bei männlichen gegenüber weiblichen Ratten festgestellt werden. Bei Untersuchungen zur Regulation der plasmamembranären Calciumpumpe (PMCA), welche in Zellen des distalen Tubulus lokalisiert ist, konnte ebenfalls ein Einfluss von Estrogenen ohne

Veränderung der PMCA-Proteinexpression festgestellt werden (31). Für das Gallensäuren-transportierende Exportprotein (BSEP) in der Leber wurde erst kürzlich eine durch Estradiol induzierte Internalisierung des Proteins beschrieben (30). Dabei kommt es zu keiner Änderung der Proteinmenge, sondern zu einer Verlagerung des Transporters in den Intrazellulärraum. Ein solcher Mechanismus könnte auch unsere Befunde erklären und würde gegen einen auf klassische Weise vermittelten genomischen Estrogen-Effekt, der auf Ebene der Gen-Transkription und konsekutiver Veränderung der Proteinsynthese abläuft, sprechen. Da der spezifische Estrogen-Rezeptor-Antagonist ICI 182780 keinen Effekt auf den Gallensäuretransport weiblicher Ratten hatte, wird die Annahme eines nicht-genomischen Estrogeneffektes auf den renalen Taurocholattransport weiter gestützt. Ein nicht-genomischer Effekt könnte möglicherweise auch durch eine Estrogen-induzierte Abnahme der Fluidität der Plasmamembran vermittelt werden. Dieser Mechanismus wurde von Simon et al. bei der Estrogen-vermittelten Abnahme der Taurocholat-Aufnahme in Hepatozyten nachgewiesen (118). Außerdem ist es bekannt, dass Estrogene Membran-Aktivität besitzen, indem sie die Lipidzusammensetzung der Zellmembran verändern (71, 140). Desweiteren könnte eine Beeinflussung von zytoplasmatischen oder an die Zellmembran gebundenen Proteinen, die die Transportrate des ASBT modulieren, den inhibitorischen Effekt der Estrogene auf den Taurocholattransport in der Niere vermitteln. Solche regulatorischen Proteine sind bisher jedoch nur unzureichend bekannt.

Bei obstruktiven Erkrankungen der Leber steigt die Ausscheidung der Gallensäuren über die Niere stark an. Dies kann auf einen adaptiven Mechanismus der Nieren zurückgeführt werden, um durch die erhöhte renale Ausscheidung die für den Organismus toxischen Gallensäuren, welche in einer Cholestase massiv erhöht sind, auszuschleiden. Der in der vorliegenden Arbeit gefundene geschlechtsspezifische Unterschied würde somit weibliche Individuen effektiver vor den schädigenden Einflüssen der Gallensäuren durch eine gesteigerte renale Taurocholat-Ausscheidung schützen. Dennoch bedarf diese Annahme weiterer Studien.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen deutlichen Unterschied im renalen Taurocholattransport zwischen männlichen und weiblichen Ratten. Dabei dürften die Estrogene für diesen geschlechtsspezifischen Unterschied verantwortlich sein. Somit könnten verschiedene physiologische Zustände, die mit verschiedenen Serum-Spiegeln an endogenen Sexualhormonen einhergehen (weiblicher Zyklus, Schwangerschaft, Menopause bei Frauen, Alter bei beiden Geschlechtern) den renalen Gallensäuren-Transport

im proximalen Tubulus über eine veränderte Estrogen-Konzentration beeinflussen. Die niedrigere tubuläre Reabsorption von Taurocholat von weiblichen Individuen gegenüber männlichen könnte unter pathologischen Zuständen des Organismus, wie zum Beispiel einer Cholestase, eine besondere Bedeutung erlangen und somit eine mögliche klinische Relevanz bekommen.

4.8 Effekt des Glukokortikoids Dexamethason auf den renal tubulären Taurocholattransport

Nowicki et al. zeigten im Jahre 1997, dass beim ilealen ASBT eine starke Abhängigkeit in der Regulation durch Glukokortikoide besteht (86). Obwohl der renal exprimierte ASBT mit dem ilealen genetisch identisch ist (25), zeigten die durchgeführten Versuche, dass der renale ASBT nicht durch Glukokortikoide (Dexamethason, Dosis 60 µg/100 g für 2,5 Tage) reguliert wird ($p > 0,05$). Die Ergebnisse funktioneller Clearance-Experimente (in-vivo) und frisch isolierter proximaler Tubuluszellen (in-vitro) wurden zusätzlich durch Western-Blot Analysen untermauert.

Die Diskrepanzen in den Ergebnissen zur oben genannten Studie könnten möglicherweise auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zunächst ist zu bemerken, dass in der erwähnten Studie keine adrenaletomierten Tiere verwendet wurden, so dass endogen vorhandene Nebennieren-Hormone wie die Mineralokortikoide nicht vollständig eliminiert worden sind. Weiterhin wurde in dieser Arbeit das endogene Glukokortikoid Corticosteron, das mineralokortikoide Partialeffekte aufweist, den Ratten intraperitoneal appliziert. Desweiteren wurden hier andere experimentelle Ansätze gewählt (Membranvesikel, Northern Blot).

Um die endogene Glukokortikoid-Produktion auszuschalten, wurde bei den Tieren in der vorliegenden Arbeit eine Adrenaletomie durchgeführt. Desweiteren wurde Dexamethason verwendet, welches als synthetisches Glukokortikoid keine mineralokortikoiden Partialeffekte aufweist. Um den Stress für die Versuchstiere möglichst zu minimieren, wurde das Hormon subkutan in die Nackenfalte verabreicht im Gegensatz zur intraperitonealen Injektion bei den Untersuchungen von Nowicki et al. . Der Gewichtsverlauf zeigte bei den mit Dexamethason substituierten Tieren eine tendenzielle Abnahme des Gewichtes, was möglicherweise auf den katabolen Effekt von Glukokortikoiden zurückgeführt werden kann. Trotzdem ließ sich keine Regulation des renalen ASBT beobachten.

Es ist auch anzunehmen, dass physiologische Unterschiede der beiden „Lokalisationen“ des ASBT in Ileum und Niere eine Rolle spielen könnten, wie zum Beispiel die Abwesenheit des in den ilealen Enterozyten zytoplasmatisch an den ASBT annektierten „Ileal Lipid Binding Protein“ (ILBP). Außerdem könnten für diesen Unterschied gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren verantwortlich sein, die im Ileum im Gegensatz zur Niere die „glucokorticoide-responsive elements“ des ASBT-Gens aktivieren. In ähnlicher Weise hatte Dexamethason einen stimulatorischen Effekt auf die Expression des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Exchanger-Protein 3 bei Ratten. Dieser regions- bzw. gewebsspezifische Effekt ließ sich nur im Ileum und proximalem Kolon, aber nicht im Jejunum, im distalen Kolon und der Niere nachweisen (24). An intakten mikrodisezierten Tubuli konnte mittels autoradiographischer Methoden gezeigt werden, dass Dexamethason an spezifische Rezeptoren entlang des gesamten Tubulus außer dem proximalen Teil bindet (11). Dieses würde die vorliegenden Ergebnisse weiter stützen. Andererseits konnten in Epithelzellen des proximalen Tubulus der Maus stimulierende Effekte durch Glukokortikoide auf die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase nachgewiesen werden, wodurch aber offensichtlich nicht der Taurocholattransport beeinflusst wird (35). In folgenden Versuchen müsste geprüft werden, ob nicht mineralokortikoide Partialeffekte eine Rolle spielen. Eine Regulation des renalen ASBT durch Glukokortikoide kann aber aufgrund vorliegender experimenteller in-vivo, in-vitro und Western-Blot Analysen für die Niere im Gegensatz zum Ileum weitgehend ausgeschlossen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die in den Glomeruli der Niere filtrierte Gallensäuren werden durch einen effizienten tubulären Reabsorptionsprozess nahezu vollständig vor der Ausscheidung mit dem Harn bewahrt und so für den Organismus konserviert. Für die Reabsorption ist der im proximalen Tubulus in der apikalen Bürstensaummembran lokalisierte Natrium-abhängige Gallensäuren Transporter (ASBT= Apical Sodium-dependent Bile Salt Transporter, SLC 10A2) zuständig. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob der durch den ASBT vermittelte tubuläre Taurocholattransport durch Sexualhormone und Glukokortikoide reguliert wird. Dabei wurden in-vitro Aufnahmestudien an frisch isolierten proximalen Tubuluszellen aus Nieren männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten, in-vivo Clearance-Experimente und Western-Blot Analysen zur Bestimmung der ASBT-Proteinmenge durchgeführt. Als Referenzsubstanz zur Untersuchung des ASBT wurde die mit ^3H radioaktiv markierte Gallensäure Taurocholat verwendet.

Die Aufnahmestudien an den frisch isolierten Tubuluszellen zeigten eine intrazelluläre ^3H -Taurocholat-Akkumulation von $5,63 \pm 0,28$ bei männlichen und von $3,68 \pm 0,43$ bei weiblichen Tieren ($p < 0,01$). Dieser geschlechtsspezifische Unterschied der zellulären Taurocholat-Aufnahme ließ sich in den Clearance-Versuchen, welche eine ^3H -Taurocholat Clearance von $133,9 \pm 28,1$ bei männlichen und von $262,0 \pm 45,4$ $\mu\text{l}/\text{min} \times 100\text{g}$ Körpergewicht bei weiblichen Ratten zeigten, bestätigen ($p < 0,05$). Zur weiteren Charakterisierung dieses geschlechtsspezifischen Unterschiedes im renal tubulären Taurocholattransportes wurden die Tiere vor Durchführung der Aufnahmestudien mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt.

Die Behandlung weiblicher Tiere mit Testosteron-Propionat (Dosis 5 mg/kg Körpergewicht) führte nur zu einer leichten, nicht signifikanten Steigerung der intrazellulären ^3H -Taurocholat-Aufnahme. Dagegen führte die Vorbehandlung männlicher Ratten mit dem Estrogen Ethinyl-Estradiol mit einer Dosis von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht zu einer signifikant um $61,6 \pm 13,4$ % gesenkten zellulären Taurocholat-Akkumulation ($p < 0,001$). Weiterhin konnten weder eine chirurgisch durchgeführte Ovariectomie noch die chemische Kastration mit dem GnRH-Analogen Buserelin (Dosis: 24 $\mu\text{g}/\text{Tag}$, 4 Wochen) die Taurocholat-Aufnahme proximaler Tubuluszellen weiblicher Ratten beeinflussen. Auch eine Vorbehandlung mit dem Estrogen-Rezeptor-Antagonist ICI 182780 (Faslodex) zeigte bei den weiblichen Tieren sowohl in einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht als auch nach Verdopplung der Dosis keinen Effekt.

Allerdings führte die Behandlung ovariectomierter Ratten mit Ethinyl-Estradiol (Dosis 5 mg/kg Körpergewicht) zu einer signifikanten Senkung des Taurocholat-Akkumulationsfaktors um $53,7 \pm 15,8$ % ($p < 0,05$). Durch Bestimmung des Serumspiegels der Gallensäuren wurde ausgeschlossen, dass die Inhibition des tubulären Gallensäuretransport durch eine Ethinyl-Estradiol bewirkte Cholestase induziert wurde.

Diese Arbeit zeigt geschlechtsspezifische Unterschiede im renalen Taurocholattransport bei Ratten, die auf einen inhibitorischen Effekt der Estrogene auf den Taurocholattransport in proximalen Tubuluszellen zurückzuführen sind. Da in den Western-Blot Analysen kein Unterschied in der ASBT-Proteinmenge der proximalen Tubuluszellen zwischen männlichen und weiblichen Ratten nachgewiesen werden konnte, liegt möglicherweise ein nicht-genomischer Mechanismus, der nicht auf Transkriptionsebene vermittelt wird, diesem Estrogen-Effekt zugrunde.

Desweiteren wurde die Regulation des renalen Taurocholattransportes durch Glukokortikoide untersucht, da es in der Literatur Hinweise auf eine Regulation des im terminalen Ileum lokalisierten Gallensäuren-Transportsystems gibt, das mit dem in der Niere lokalisierten ASBT identisch ist. Als Substanz wurde das synthetische Glukokortikoid Dexamethason, welches keine mineralokortikoiden Partialeffekt aufweist, verwendet.

Sowohl in den Clearance-Versuchen als auch bei den Aufnahmestudien an frisch isolierten proximalen Tubuluszellen zeigte sich bei den vorbehandelten männlichen Ratten mit einer Dosis von 60 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht kein signifikanter Unterschied in der Taurocholat-Clearance bzw. zellulären Akkumulation gegenüber den Kontrolltieren ($p > 0,05$). Auch in den Western-Blot Analysen konnte hier kein Unterschied der ASBT-Proteinmenge bei den vorbehandelten Ratten festgestellt werden.

Diese verschiedenen experimentellen Ansätze zeigen, dass eine mögliche Regulation des renalen ASBT im proximalen Tubulus durch Glukokortikoide weitgehend ausgeschlossen werden kann.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Accatino L, Simon FR. 1976. *J. Clin. Invest.* 57: 496-508
2. Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinizy JL, Robertson WE, Lasater J, Caliguiri A, Tretjak Z, LeSage GD. 1997. Functional expression of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 113: 1734-1740
3. Amelsberg A, Schteingart CD, Ton-Nu HT, Hofmann AF. 1996. Carrier-mediated jejunal absorption of conjugated bile acids in the guinea pig. *Gastroenterology* 110: 1098-1106
4. Anton FM, Garcia Puig J, Ramos T, Gonzalez P, Ordas J. 1986. Sex differences in uric acid metabolism in adults: evidence for a lack of influence of estradiol-17 beta (E2) on the renal handling of urate. *Metabolism* 35: 343-348
5. Back P. 1973. *Clin. Chim. Acta* 44: 199-207
6. Bahar RJ, Stolz AS. 1999. Bile acid transport. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 28: 27-58
7. Baringhaus KH, Matter H, Stengelin S, Kramer W. 1999. Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁺/bile acid cotransporters of the rabbit. II. A reliable 3 D QSAR pharmacophore model for the ileal Na⁺/bile acid cotransporter. *J. Lipid Res.* 40: 2158-2168
8. Barnard JA, Ghishan FK. 1986. Methylprednisolone accelerates the ontogeny of sodium-taurocholate cotransport in rat ileal brush border membranes. *J. Lab. Clin. Med.* 108: 549-555
9. Barnes S, Gollan JL, Billing BH. 1977. The role of tubular reabsorption in the renal excretion of bile acids. *Biochem. J.* 166: 65-73
10. Berseth RO, Kjellstrand CM. 1984. Radiologic contrast-induced nephropathy. *Med. Clin. North Am.* 68: 351-370
11. Bonvalet JP. 1987. Binding and action of aldosterone, dexamethasone, 1-25(OH)₂D₃, and estradiol along the nephron. *J. Steroid Biochem.* 27: 953-961
12. Boogard PJ, Mulder GJ, Nagelkerke JF. 1989. Isolated proximal tubular cells from rat kidney as an in vitro model for studies on nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 101: 135-143
13. Bossard R, Stieger B, O'Neill B, Fricker G, Meier PJ. 1993. Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J. Clin. Invest.* 91: 2714-2720
14. Bowman HM, Hook JB. 1972. Sex differences in organic ion transport by rat kidney. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141 : 258-262

15. Brandoni A, Villar SR, Torres AM. 2004. Gender-related differences in pharmacodynamics of furosemide in rats. *Pharmacology* 70: 107-112
16. Bräunlich H, Meinig T, Grosch U. 1993. Postnatal development of sex differences in renal tubular transport of p-aminohippurate (PAH) in rats. *Exp. Toxic. Pathol.* 45: 309-313
17. Brock WJ, Vore M. 1984. Characterization of uptake of steroid glucuronides into isolated male and female rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229: 175-181
18. Buchwald H, Varco RL, Matts JP, et al. 1990. Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. Report of the program on the surgical control of the hyperlipidemias (POSCH). *N. Engl. J. Med.* 323: 946-955
19. Buhman KK, Furumoto EJ, Donkin SS, Story JA. 2000. Dietary psyllium increases expression of the ileal apical sodium-dependent bile acid transporter mRNA coordinately with dose-responsive changes in bile acid metabolism. *J. Nutr.* 130: 2137-2142
20. Buist SCN, Cherrington NJ, Choudhuri S, Hartley DP, Klassen CD. 2002. Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 145-151
21. Burckhardt G, Kramer W, Kurz G, Wilson FA. 1987. Photoaffinity labeling studies of the rat renal sodium bile salt cotransport system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 1018-1023
22. Carey MC and Duane WC. 1994. Enterohepatic circulation. In *The liver: Biology and Pathobiology*, ed. IM Arias, JL Boyer, N Fausto, WB Jakoby, DA Schacter, DA Shafritz, pp. 719-767. New York: Raven Press
23. Cerruti JA, Quaglia NB, Torres AM. 2001. Characterization of the mechanisms involved in the gender differences in p-aminohippurate renal elimination in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79: 805-813
24. Cho JH, Musch MW, DePaoli AM, Bookstein CM, Xie Y, Burant CF, Rao MC, Chang EB. 1994. Glucocorticoids regulate Na⁺/H⁺ exchange expression and activity in region- and tissue-specific manner. *Am. J. Physiol.* 267: C796-803
25. Christie DM, Dawson PA, Thevananther S, Shneider BL. 1996. Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am. J. Physiol.* 271: G 377-385
26. Classen J, Belka C, Paulsen F, Budach W, Hoffmann W, Bamberg M. 1998. Radiation-induced gastrointestinal toxicity. Pathophysiology, approaches to treatment and prophylaxis. *Strahlenther. Onkol.* 174 (suppl. 3): 82-84. Review.
27. Coppola CP, Grosche JR, Arrese M, Ancowitz B, Madsen J, Vanderhoof J, Shneider BL. 1998. Molecular analysis of the adaptive response of intestinal bile acid transport after ileal resection of the rat. *Gastroenterology* 115: 1172-1178

28. Cowen AE, Korman MG, Hofmann AF, Thomas PJ. 1975. *Gastroenterology* 68: 1567-1573
29. Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA. 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am. J. Physiol.* 274: G 157-169
30. Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Sanchez Pozzi EJ, Vore M, Coleman R, Roma MG. 2003. Estradiol-17- β -D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285: G449-459
31. Dick IM, Liu J, Glendenning P, Prince RL. 2003. Estrogen and androgen regulation of the plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 212: 11-18
32. Duane W. 1995. Abnormal bile acid absorption in familial hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* 36: 96-107
33. Duane WC, Hartich LA, Bartman AE, Ho SB. 2000. Diminished gene expression of ileal apical sodium bile acid transporter explains impaired absorption of bile acid in patients with hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* 41: 1384-1389
34. Echeverria OM, Maciel AG, Traish AM, Woitz HH, Ubaldo E, Vasquezin GH. 1994. Immuno-electron microscopic localization of estradiol receptor in cells of male and female reproductive and non-reproductive organs. *Biol. Cell* 81: 257-265
35. Ellis D, Sothi TD, Curthoys NP, Ballou B, Avner ED. 1988. Regulation of glucocorticoid receptors and Na-K ATPase activity by hydrocortisone in proximal tubular epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24: 811-816
36. Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diarasio RB. 1994. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 269: 19375-19379
37. Fekete A, Vannay A, Ver A, Vasarheyli B, Muller V, Ouyang N, Reusz G, Tulassay T, Szabo AJ. 2004. Sex differences in the alterations of Na(+), K(+)-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J. Physiol.* 555: 471-480
38. Frick A. 1968. Reabsorption of inorganic phosphate in the rat kidney. I. Saturation of transport mechanism. II. Suppression of fractional phosphate reabsorption due to expansion of extracellular fluid volume. *Pflügers Arch.* 304: 351-364
39. Gambling L, Dunford S, Wilson CA, McArdle HJ, Baines DL. 2004. Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gammaENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney Int.* 65: 1774-1781
40. Geier A, Dietrich CG, Gerloff T, Haendly J, Kullack-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gattung C. 2003. Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609: 87-94

41. Ghandi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blaschke TF. 2004. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 : 499-523
42. Gradishar WJ, Jordan VC. 1997. Clinical potential of new antiestrogens. *J. Clin. Oncol.* 15: 840-852
43. Greenstein BD, Fitzpatrick FT, Kendall MD, Wheeler MJ. 1987. Regeneration of the thymus in old male rats treated with a stable analogue of LHRH. *J. Endocrinol.* 112: 345-350
44. Grist M, Wambolt RB, Bondy GP, English DR, Allard MF. 2002. Estrogen replacement stimulates fatty acid oxidation and impairs postischemic recovery of hearts from ovariectomized female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 1001-1007
45. Hagenbuch B and Meier PJ. 1994. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺ bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest.* 93: 1326-1331
46. Hagenbuch B, Meier PJ. 1996. Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin. Liver Dis.* 16: 129-136
47. Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ. 1991. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10629-10633
48. Hallen S, Branden M, Dawson PA, Sachs G. 1999. Membrane insertion scanning of the human ileal sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry* 38: 11379-11388
49. Hallen S, Mareninova O, Branden M, Sachs G. 2002. Organization of the membrane domain of the human liver sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry* 41: 7253-7266
50. Hara S, Higaki J, Higashino K, Iwai M, Takasu N, Miyata K, Tonda K, Nagata K, Goh Y, Mizui T. 1997. S-8921, an ileal Na⁺/bile acid cotransporter inhibitor decreases serum cholesterol in hamsters. *Life Sci.* 60: 365-370
51. Hempel E, Gunther P, Neumann G, Muller B. 1978. Experimental studies on the castration osteoporosis in the rat. II. Behaviour of bone minerals. *Zentralbl. Gynakol.* 100: 1391-1398
52. Hermenegildo C, Cano A. 2000. Pure anti-estrogens. *Hum. Reprod. Update* 6: 237-243
53. Heubi J. 1986. Role of thyroxine on postnatal development of ileal active bile salt transport. *Am. J. Physiol.* 251: G 237-242
54. Heubi JE, Balistreri WF, Partin JC, Schubert WK, Suchy FJ. 1980. Enterohepatic circulation of bile acids in infants and children with ileal resection. *J. Lab. Clin. Med.* 95 : 231-240
55. Higaki J, Hara S, Takasu N, Tonda K, Miyata K, Shike T, Nagata K, Mizui T. 1998. Inhibition of ileal Na⁺/bile acid cotransporter by S-8921 reduces serum cholesterol

- and prevents atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1304-1311
56. Hofmann A. 1994. Bile acids. In *The liver: Biology and Pathobiology*, ed. IM Arias, JL Boyer, N Fausto, WB Jakoby, DA Schacter, DA Shafritz, pp. 677-717. New York: Raven Press
 57. Huang KC, McIntosh BJ. 1955. Effect of sex hormones on renal transport of p-aminohippuric acid. *Am. J. Physiol.* 137: 387-390
 58. Ichihashi T, Izawa M, Miyata K, Mizui T, Hirano K, Takagishi Y. 1998. Mechanism of hypocholesterolemic action of S-8921 in rats: S-8921 inhibits ileal bile acid absorption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284 : 43-50
 59. Izzat N, Deshazer M, Loose-Mitchell D. 2000. New molecular targets for cholesterol-lowering therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 : 315-320
 60. Jung D, Fantin AC, Scheurer U , Fried M, Kullak-Ublick GA. 2004. Human ileal bile acid transporter gene ASBT (SLC10A2) is transactivated by the glucocorticoid receptor. *Gut* 53: 78-84
 61. Karlsson S, Mantyla E, Hirsimaki Y, Niemi S, Nieminen L, Nieminen K, Kangas L. 1999. The effect of toremifene on bone and uterine histology and on bone resorption in ovariectomised rats. *Pharmacol. Toxicol.* 84: 72-80
 62. Koop I, Schindler M, Bosshammer A, Scheibner J, Stange E, Koop H. 1996. Physiological control of cholecystokinin release and pancreatic enzyme secretion by intraduodenal bile acids. *Gut* 39: 661-667
 63. Köppel H, Christ M, Yard BA, Bär PC, van der Woude FJ, Wehling M. 2003. Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 1297-1302
 64. Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhnen A, Heuer H, Becker W, Corsiero D, Girbig F, Noll R, Weyland C. 1999. Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁺/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J. Lipid Res.* 40: 1604-1617
 65. Krecek J. 1978. Effect of ovariectomy of females and oestrogen administration to males during the neonatal critical period on salt intake in adulthood in rats. *Physiol. Bohemoslov.* 27: 1-5
 66. Lammert F, Paigen B, Carey MC. 1998. Localization of the ileal sodium-bile salt cotransporter gene (Slc10a2) to mouse chromosome 8. *Mammalian Genome* 9: 173-174
 67. Lazardis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF. 1997. Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest.* 100: 2714-2721
 68. Lazardis KN, Tietz P, Wu T, Kip S, Dawson PA, La Russo NF. 2000. Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11092-11097

69. Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A, Setchell KD, Kramer W, Boyer JL. 2001. Adaptive regulation of bile acid transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 121: 1473-1484
70. Lewis MC, Brieady LE, Root C. 1995. Effect of 2164U90 on ileal bile acid absorption and serum cholesterol in rats and mice. *J. Lipid Res.* 36: 1098-1105
71. Liang Y, Belford S, Tang F, Prokai L ; Simpkins JW, Hughes JA. 2001. Membrane fluidity effects of estratrienes. *Brain Res. Bull.* 54: 661-668
72. Lin JI, Masuda S, Saito H, Inui KI. 2002. Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int.* 62: 514-524
73. Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, Sabolic I. 2004. Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287: F124-138
74. Lu R, Kanai N, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. 1996. Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone. *Am. J. Physiol.* 270: F332-337
75. Lücke H, Stange G, Kinne R, Murer H.1978. Taurocholate-sodium co-transport by brush-border membrane vesicles isolated from rat ileum. *Biochem. J.* 174: 951-958
76. Lundeen SG, Carver JM, McKean ML, Winneker RC. 1997. Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology* 138: 1552-1558
77. MacGregor JI, Jordan VC. 1998. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol. Rev.* 50: 151-196
78. Martins JP, Monteiro JC, Paixao AD. 2003. Renal function in adult rats subjected to prenatal dexamethasone. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30: 32-37
79. Masereeuw R, van den Bergh EJ, Bindels RJ, Russel FG. 1994. Characterization of fluorescein transport in isolated proximal tubular cells of the rat: Evidence for mitochondrial accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 1261-1267
80. Meilhof W, Kern F. 1968. Bile acid malabsorption in regional ileitis, ileal resection and mannitol induced diarrhoe. *J. Clin. Invest.* 47: 261-267
81. Moguilewsky M, Tournemine C. 1988. The antiandrogen anandron potentiates the castrating effect of the LH-RH agonist buserelin in the rat. *Am. J. Clin. Oncol.* 11 Suppl 2: S148-151
82. Morris ME, Lee HJ, Predko LM. 2003. Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds. *Pharmacol. Rev.* 55: 229-240
83. Müller H, Gabriels G, Greven J. 1999. Urate transport in isolated proximal tubular cells of the rat kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 359: No.3 452

84. Mützel W, Siefer HM, Speck U. 1980. Biochemical- pharmacological properties of iohexol. *Acta radiol. Suppl.* 362: 111-115
85. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DPG. 2004. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 27-41
86. Nowicki MJ, Shneider BL, Paul JM, Heubi JE. 1997. Glucocorticoids upregulate taurocholate transport by ileal brush border membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 273: G 197-203
87. Nyhlin H, Merrick M, Eastwood M. 1994. Bile acid malabsorption in Crohn`s disease and indications for its assessment using SeHCAT. *Gut* 35: 90-93
88. O`Brien S, Mulcahy H, Fenlon H, O`Broin A, Casey M, Burke A, FitzGerald MX, Hegarty JE. 1993. Intestinal bile acid malabsorption in cystic fibrosis. *Gut* 34: 1137-1141
89. Oelckers P and Dawson PA. 1995. Cloning and chromosomal localization of the human ileal lipid-binding protein. *Biochem. Biophys. Acta.* 1257: 199-202
90. Oelckers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA. 1997. Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J. Clin. Invest.* 99 : 1880-1887
91. Ohkochi N, Andoh T, Izumi U, Igarashi Y, Ohi R. 1997. Disorder of bile acid metabolism in children with short bowel syndrome. *J. Gastroenterol.* 32: 472-479
92. Ostrow JD. 1993. Metabolism of bile salts in cholestasis in humans. In : Tavolin N, Berk PD (eds.): *Hepatic Transport and Bile Secretion: physiology and pathophysiology.* New York Raven Press: pp. 673-712
93. Ouerghi D, Rivest S, Richard D. 1992. Adrenalectomy attenuates the effect of chemical castration on energy balance in rats. *J.Nutr.* 122: 369-373
94. Patterson MK Jr.1979. *Methods Enzymol.* 58: 141-152
95. Pelletier G. 2000. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol. Histopathol.* 15: 1261-1270
96. Reyes JL, Melendez E, Alegria A, Jamillo-Juarez F. 1998. Influence of sex differences on the renal secretion of organic anions. *Endocrinology* 139: 1581-1587
97. Riepl RL, Fiedler F, Ernstberger M, Teufel J, Lehnert P. 1996. Effect of intraduodenal taurodeoxycholate and L-phenylalanine on pancreatic secretion and on gastroenteropancreatic peptide release in man. *Eur. J. Med. Res.* 1: 499-505
98. Root C, Smith CD, Sunseth SS, Pink HM, Wilson JG, Lewis MC. 2002. Ileal bile acid transporter inhibition, CYP7A1 induction, and antilipemic action of 265W94. *J. Lipid Res.* 43: 1320-1330
99. Root C, Smith CD, Winegar DA, Brieady LE, Lewis MC. 1995. Inhibition of ileal sodium-dependent bile acid transport by 2164U90. *J. Lipid Res.* 36: 1106-1115

100. Rudman D, Kendall FE. 1957. Bile acid content of human serum. II. The binding of cholanic acid by human plasma proteins. *J. Clin. Invest.* 36: 538-542
101. Russell DW, Setchell KDR. 1992. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31: 4737-4749
102. Sacchettini JC, Hauff SM, Van Camp SL, Cistola DP, Gordon JI. 1990. Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in ileal epithelium. *J. Biol. Chem.* 265: 19199-19207
103. Saeki T, Matoba K, Furukawa H, Kirifuji K, Kanamoto R, Iwami K. 1999. Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Biochem. Tokyo* 125: 846-851
104. Sandow J, von Rechenberg W, Baeder C, Engelbart K. 1980. Antifertility effects of an LH-RH analogue in male rats and dogs. *Int. J. Fertil.* 25: 213-221
105. Sauer P, Stiehl A, Fitscher BA, Riedel HD, Benz C, Kloters-Plachky P, Stengelin S, Stremmel W, Kramer W. 2000. Downregulation of ileal bile acid absorption in bile-duct-ligated rats. *J. Hepatol.* 33: 2-8
106. Schaison G. 1989. GnRH and its analogs – structure, mechanism of action and therapeutic uses. *J. Steroid Biochem.* 33: 795-799
107. Schlattjan JH, Bengler S, Herrler A, von Rango U, Greven J. 2005. Regulation of taurocholate transport in freshly isolated proximal tubular cells of the rat kidney by protein kinases. *Nephron Physiol.* 99: 35-42
108. Schlattjan JH, Biggemann F, Greven J. 2005. Gender differences in renal tubular taurocholate transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 371: 449-456
109. Schlattjan JH, Fehsenfeld H, Greven J. 2003a. Effect of the dimeric bile acid analogue S 0960, a specific inhibitor of the apical sodium-dependent bile salt transporter in the ileum, on renal handling of taurocholate. *Drug Res.* 53, 12: 837-843
110. Schlattjan JH, Winter C, Greven J. 2003b. Regulation of renal tubular bile acid transport in the early phase of an obstructive cholestasis in the rat. *Nephron Physiol.* 95: 49-56
111. Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hoffmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B. 1998. Substrate specificity of the rat liver Na⁺/bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am. J. Physiol.* 274: G 370-375
112. Schwarz HP, Bergmann KV, Paumgartner G. 1974. *Clin. Chim. Acta* 50: 197-206
113. Sciaretta G, Bonazzi L, Monti M, Furno A, Mazzoni M, Mazzetti M, Gritti F, Malaguti P. 1994. Bile acid malabsorption in AIDS-associated chronic diarrhea: a prospective 1-year study. *Am. J. Gastroenterol.* 89: 379-381
114. Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, Shefer S, Bollileni JS, Gonzalez FJ, Breslow JL, Stoffel M. 2001. Hepatocyte nuclear factor-1 α is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat. Genet.* 27: 375-382

115. Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ. 1995. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest.* 95: 745-754
116. Shneider BL, Michaud GA, West AB, Suchy FJ. 1993. The effects of bile acid feeding on the development of ileal bile acid transport. *Pediatr. Res.* 33: 221-224
117. Shneider BL, Setchell KDR, Crossman MW. 1997. Fetal and neonatal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter in the rat ileum and kidney. *Pediatr. Res.* 42: 189-194
118. Simon FR, Fortune J, Iwahashi M, Bowman S, Wolkoff A, Sutherland E. 1999. Characterization of the mechanisms involved in the gender differences in hepatic taurocholate uptake. *Am. J. Physiol.* 276: G556-565
119. Simon FR, Fortune J, Iwahashi M, Qadri I, Sutherland E. 2004. Multihormonal regulation of hepatic sinusoidal Ntcp gene expression. *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.* 287(4): G782-794
120. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. 2000. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102: 731-744
121. Small DM. 1997. Point mutations in the ileal bile salt transporter cause leaks in the enterohepatic circulation leading to severe chronic diarrhoe and malabsorption. *J. Clin. Invest.* 99: 1807-1808
122. Stein EA, Rhyne JM, McKenney J, Bays H, Roth E, Breed S, Rolleri R. 2001. Intestinal bile acid transport (IBAT) inhibition: results of a 4 week pilot study of 264W94 , a novel IBAT inhibitor in hypercholesterinemia (abstract). *XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism. New York, Sept. 9-12, 2001*
123. Stelzner M, Hoagland V, Somasundaram S. 2000. Distribution of bile acid absorption and bile acid transporter gene message in the hamster ileum. *Pflügers Arch.* 440: 157-162
124. Steuerwald M, Bucher HC, Muller-Brand J, Gotze M, Roser HW, Gyr K. 1995. HIV-enteropathy and bile acid malabsorption: response to cholestyramine. *Am. J. Gastroenterol.* 90: 2051-2053
125. Stiehl A. 1974. *Eur. J. Clin. Invest.* 4: 59-63
126. St-Pierre MV, Kullack-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ. 2001. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J. Exp. Biol.* 204: 1673-1686
127. Stravitz RT, Sanyal AJ, Pandak WM, Vlahcevic ZR, Beets JW, Dawson PA. 1997. Induction of sodium-dependent bile acid transporter messenger RNA, protein and activity in rat ileum by cholic acid. *Gastroenterology* 113: 1599-1608
128. Tollefson MB, Vernier WF, Huang HC , Chen FP, Reinhard EJ, Beaudry J, Keller BT, Reitz DB. 2000. A novel class of apical sodium co-dependent bile acid transporter

- inhibitors: the 2,3-disubstituted-4-phenylquinolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 277-279
129. Trauner M, Boyer JL. 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 83: 633-671
 130. Urakami Y, Nakamura N, Takahashi K, Okuda M, Saito H, Hashimoto Y, Inui K. 1999. Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Lett.* 461: 339-342
 131. Urakami Y, Okuda M, Saito H, Inui K. 2000. Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Letters* 473: 173-176
 132. Urakami Y. 2002. Molecular diversity of organic cation transporter (OCT) mediating renal excretion of drugs. *Yakugaku Zasshi* 122: 957-965
 133. Wakeling AE, Bowler J. 1987. Steroidal pure antioestrogens. *J. Endocrinol.* 112: R 7-10
 134. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. 1991. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* 51: 3867-3873
 135. Walters HC, Craddock AL, Fusegawa H, Willingham MC, Dawson PA. 2000. Expression, transport properties and chromosomal localization of organic anion transporter subtype 3. *Am. J. Physiol.* 279: G 1188-1200
 136. Weber A, Roy C, Morin C, Lasalle R. 1973. Malabsorption of bile acids in children with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 289: 1001-1005
 137. Weiner IM, Glasser JE, Lack L. 1964. Renal excretion of bile acids: Taurocholic, glycocholic and cholic acids. *Am. J. Physiol.* 207: 964-970
 138. Weinmann SA, Carruth MW, Dawson PA. 1998. Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J. Biol. Chem.* 273: 34691-34695
 139. Wess G, Kramer W, Enhsen A, Glombik H, Barighaus KH, Boger G, Urmann M, Bock K, Kleine H, Neckermann G, et al. 1994. Specific inhibitors of ileal bile acid transport. *J. Med. Chem.* 37: 873-875
 140. Whiting KP, Restall CJ, Brain PF. 2000. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci.* 67: 743-757
 141. Wilson FA, Burckhardt G, Murer H, Rumrich G, Ullrich KJ. 1981a. Sodium-coupled taurocholate transport in the proximal convolution of the rat kidney in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.* 67: 1141-1150
 142. Wilson FA, Treanor LL. 1981b. Studies of relationship among bile-acid uptake, Na⁺-K⁺-ATPase, and Na⁺ gradient in isolated cells from rat ileum. *Gastroenterology* 81: 54-60
 143. Wilson FA. 1981c. Intestinal bile acid transport. *Am. J. Physiol.* 241: G83-92

144. Wisel S, Sundaram U. 2000. Differential regulation of intestinal Na-bile acid co-transport in the normal and chronic inflamed ileum. *Gastroenterology* 118: A 78
145. Wong MH, Oelckers P, Craddock AL, Dawson PA. 1994. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Biol. Chem.* 269: 1340-1347
146. Wong MH, Oelckers P, Dawson PA. 1995. Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J. Biol. Chem.* 270: 27228-27234
147. Wong MH, Rao PN, Pettenati MJ, Dawson PA. 1996. Localization of the ileal sodium-bile acid cotransporter gene (SLC10A2) to human chromosome 13q33. *Genomics* 33: 538-540
148. Xu G, Shneider BL, Shefer S, Nguyen LB, Batta AK, et al. 2000. Ileal bile acid transport regulates bile acid pool, synthesis and plasma cholesterol levels differently in cholesterol-fed rats and rabbits. *J. Lipid Res.* 41: 298-304
149. Zhang EY, Phelps MA, Banerjee A, Khantwal CM, Chang C, Helsper F, Swaan PW. 2004. Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry* 43: 11380-11392

7. Danksagungen

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Joachim Greven für die Überlassung des Themas und die von ihm jederzeit gewährte menschliche sowie fachliche Betreuung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Jan Henrik Schlattjan, der mir bei der täglichen Arbeit im Labor hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich bei Misserfolgen immer wieder ermutigte.

Den Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Frau Birgit Feulner und den Tierpflegern der Medizinisch-Technischen Institute der RWTH-Aachen, möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und den reibungslosen Ablauf meiner Versuche bedanken.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern, Meike und all denen bedanken, die mir immer viel Geduld und Verständnis in den letzten Jahren entgegenbrachten..

8. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Frank Biggemann
Geburtsdatum: 07.06.1978
Geburtsort: Mönchengladbach
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung

1984-1988 Gemeinschaftsgrundschule Rheindahlen, Mönchengladbach
1988-1997 Stiftisches Humanistisches Gymnasium, Mönchengladbach
06/1997 Abitur

Studium

Seit 10/1999 Studium der Humanmedizin an der RWTH-Aachen:

03/2002 Ärztliche Vorprüfung
03/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2005-10/2006 Praktisches Jahr: Klinken Maria Hilf, Mönchengladbach
1. Tertial: Innere Medizin
2. Tertial: Neurologie
3. Tertial: Chirurgie

10/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Studienbegleitende Tätigkeiten

Pflegedienstpraktika:

08-09/2000 und
02-03/2001 Medizinische Klinik 1 + 2, Krankenhaus St. Franziskus,
Mönchengladbach

Famulaturen:

07-08/2002 Internistische Gemeinschaftspraxis Dres. Borchard, Grünke,
Bornikoel, Mönchengladbach
08-09/2004 Medizinische Klinik 2, Krankenhaus St. Franziskus,
Mönchengladbach
09-10/2004 und
02/2005 Klinik für diagnostische und interventionelle Radiologie,
Krankenhaus Maria Hilf, Mönchengladbach

Nebentätigkeiten:

	Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, RWTH-Aachen:
WS 01/02	Kurs der makroskopischen Anatomie
SS 02	Kurs der makro- und mikroskopischen Neuroanatomie
WS 02/03	Kurs der makroskopischen Anatomie

Publikationen:

Begutachtete Zeitschrift:	Schlattjan JH, Biggemann F, Greven J. 2005. Gender differences in renal tubular taurocholate transport. <i>Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol</i> . 371: 449-456
---------------------------	--

Posteröffentlichung:	Biggemann F, Schlattjan JH, Greven J. 2004. Gender differences in renal tubular taurocholate transport. <i>Kidney Blood Press Res</i> . 27: 364. P09.08
----------------------	---

Berufliche Tätigkeit:

Seit 12/2006	Assistenzarzt , Klinik für Neurologie, Kliniken Maria Hilf, Mönchengladbach
--------------	--

Mönchengladbach, den 29.08.2007