

Hongying Gan-Schreier

Dr. sc. hum.

Untersuchung des Transportes von Gallensäure-Intermediaten über die Membran von Rattenleberperoxisomen

Geboren am 25. Juli 1967 in Shanghai, V.R. CHINA

Diplom der Fachrichtung Chemie am Juni 1999 an der Philipps-Universität Marburg

Promotionsfach: Pädiatrie

Doktorvater: Prof. Dr. med., Prof. h.c. (RCH) G.F. Hoffmann

Zusammenfassung

Die Synthese der Gallensäuren findet kompartiment-übergreifend in Cytoplasma, Endoplasmatischem Retikulum, Mitochondrien und Peroxisomen statt, was vielfältige und komplexe Transportschritte zwischen den einzelnen Kompartimenten notwendig macht. In den Peroxisomen ist die Umwandlung von THCA bzw. DHCA in Chol- und Desoxycholsäure als die letzten Schritte der Biosynthese von Gallensäuren lokalisiert. Die produzierten Gallensäuren verlassen die Peroxisomen in Form von Glycin- und Taurin-Konjugaten. Während jedoch Synthese, sinusoidale Aufnahme und canaliculäre Exkretion von Gallensäuren bereits gut untersucht sind, ist über den interkompartimentellen Transport neusynthetisierter Gallensäuren und ihrer Vorläufer wenig bekannt.

Ziel dieser Dissertation war es, *in vitro* Transportsysteme von Gallensäurevorläufern über die Peroxisomenmembran zu charakterisieren. Dazu wurde ein nicht radioaktiver Transportassay entwickelt, mit dem die Endprodukte der Gallensäure-Biosynthese mittels Tandem Massenspektrometrie qualitativ erfasst und quantifiziert werden können.

Sehr reine Peroxisomenfraktionen wurden aus Rattenleber mittels differentieller Zellfraktionierung und Dichte-Gradienten Zentrifugation isoliert und unter verschiedenen Bedingungen mit D/THCA oder ihren CoA Estern inkubiert.

Die chemische Synthese der CoA Ester von Gallensäure-Vorläufern wurde durchgeführt und Ausbeute und Qualität wurden mittels Ellmann's-Reagenz und Tandem Massenspektrometrie ermittelt.

Die Produktion der Gallensäure-Konjugate wurde nur bei Inkubationen mit D/THCA-CoA Estern detektiert und ist bei 20 nmol und 100 µg peroxisomalen Proteinen maximal. Es konnte gezeigt werden, dass D/THCA-CoA Ester in Peroxisomen ohne Verbrauch von ATP/Mg²⁺ transportiert werden können.

Deutliche Hemmeffekte auf die Konjugat-Produktion wurden festgestellt, wenn Peroxisomen vor dem Inkubationsansatz mit Protease K, Histonen oder Triton X-100 behandelt wurden.

Auch wird die Konjugat-Produktion durch VLCFA-CoA Ester gehemmt. Hier wurde ein kompetitiver Hemmungsmechanismus postuliert. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein oder mehrere Proteine am Transport der Gallensäuren- und VLCFA-CoA Ester gleichzeitig beteiligt sind.

Im folgenden wurden verschiedene Erkrankungen der Gallensäure-Biosynthese anhand eines für sie charakteristischen und spezifischen Gallensäuremusters im Urin, Plasma sowie Trockenblut identifiziert.

Dazu wurde eine Produkt-Ionen-Scan Methode an einem ESI-MS/MS etabliert, mit der die spezifischen Fragmente der vier bekannten Gallensäure-Biosynthese-Defekte qualitativ und quantitativ analysiert wurden. Die altersabhängigen Referenzwerte der gesunden Probanden wurden ermittelt, um pathologische Erhöhungen der Konzentrationen atypischer Gallensäuren eindeutig erfassen zu können. Für die Analyse der DHCA und THCA, die bei Kindern mit Zellweger-Syndrom im Blut signifikant erhöht sind, wurde eine GC-MS Methode für Plasma-Proben und eine Tandem MS Methode für Trockenblut-Proben etabliert. Die hier vorgestellten Methoden erwiesen sich als geeignet um eine sichere Diagnostik anbieten zu können, die eine Früherkennung möglich macht und somit einen rechtzeitigen Therapiestart gewährleistet.