

Andreas Stefan Welker
Dr. med.

Regulation von Membrantransportproteinen durch oxidativen Stress Entwicklung und Charakterisierung eines In-vivo-Modells der Ratte

Geboren am 08.10.1978 in Mainz
Staatsexamen am 08.12.2006 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. D. Rost

Oxidativer Stress spielt eine wichtige pathogenetische Rolle bei chronischen Entzündungen der Leber u.a. bei Hämochromatose, alkoholischer Hepatitis, nicht-alkoholischer Fettleberhepatitis (NASH) und Paracetamolintoxikation. Die Auswirkungen von chronischem oxidativem Stress auf die Leber sind bisher mangels geeigneter Tiermodelle nur unzureichend erforscht. Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines Tiermodells zum chronisch oxidativen Stress in Rattenlebern und dessen Rolle während einer Cholestase. Außerdem sollten die Zusammenhänge zwischen der oxidativen Belastung und der Regulation von Membrantransportproteinen untersucht werden.

Das Enzym Glucoseoxidase (GOX), das unter Verbrauch von Glucose und Sauerstoff kontinuierlich H_2O_2 bildet, wurde über 3 Tage in die Schwanzvene von Ratten injiziert. Kontrolltiere bekamen das hitzeinaktivierte Enzym bzw. NaCl verabreicht. Nach 72 Stunden wurden geeignete Proben entnommen und Blutgase, Leberenzyme, Serumeisen, Redox-Status sowie die GOX-Aktivität in den Lebern bestimmt. Galleflussmessung und biliäre Ausscheidung von [3H]Leukotrien C_4 sowie [^{14}C]Taurocholsäure wurden ermittelt. GOX wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers durch Immunoblot und Immunfluoreszenzanalyse in den Lebern nachgewiesen. Die Morphologie der Lebern wurde durch Histologie und Elektronenmikroskopie beurteilt. Die Expression der Membrantransportproteine und des Transferrin-Rezeptors wurde mittels Immunoblot und Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

Nach i.v. Injektion kommt es zur Anreicherung von GOX in der Leber. Dabei ist der Großteil des Proteins in den Sinusoiden lokalisiert. Das Enzym bleibt aktiv und bildet unter den gewählten Bedingungen pathophysiologische Mengen von H_2O_2 in der Leber. Die über drei Tage erreichte Aktivität in der Leber lag hierbei um $0,4 \mu M/s$. Bezogen auf die in der Literatur angegebenen Werte für Neutrophile von $0,15-2 \mu M/s$ zeigt sich, dass in diesem Tiermodell für eine Entzündung typische H_2O_2 -Bildungsraten erreicht wurden. Die GSH- und

GSSG-Werte der Lebern der behandelten Tiere bestätigen eine oxidative Belastung. Aufgrund dieser chronischen H_2O_2 -Belastung kommt es zu einer signifikanten 13 %igen Abnahme des Galleflusses, jedoch zu keiner nachweisbaren Veränderung der Ausscheidungskinetik von [^3H]Leukotrien C_4 und [^{14}C]Taurocholsäure. Die Transaminasen im Serum unterscheiden sich nicht in den Versuchsgruppen. Morphologische Veränderungen konnten weder durch lichtmikroskopische noch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gefunden werden. Es wird eine differentielle Regulation der Expression von Membrantransportproteinen und des Transferrin-Rezeptors hervorgerufen. Der apikale Transporter Mrp2 wird auf 69 ± 13 % herunterreguliert ($p < .05$). Auch die apikal gelegene Bsep wird signifikant ($p < .05$) auf 67 ± 15 % vermindert. P-Gps, Mdr2 und Oatp1 unterliegen jedoch keiner signifikanten Regulation durch die H_2O_2 -Belastung. Die Anzahl der basolateralen Transporter Mrp3 (54 ± 15 %), Oatp2 (52 ± 15 %), Oatp4 (44 ± 2 %) und Ntcp (43 ± 19 %) nimmt ebenfalls signifikant ab ($p < .05$). Der Transferrin-Rezeptor (TfR) wird hingegen unter H_2O_2 -Belastung auf 240 ± 32 % ($p < .05$) heraufreguliert und ein Abfall des Serumeisens herbeigeführt.

Das vorgestellte GOX-Tiermodell ermöglicht es zum ersten Mal, den direkten und alleinigen Einfluss von chronisch-oxidativem Stress durch H_2O_2 auf Morphologie und Funktion der Leber zu untersuchen. Hierbei stellten wir fest, dass trotz einer pathophysiologischen Belastung die Morphologie nicht verändert wurde. Dem stand eine differentielle Regulation von Membrantransportproteinen und des Transferrin-Rezeptors durch H_2O_2 gegenüber. Durch die chronische Belastung mit H_2O_2 wurde der Gesamtgallefluss der Leber um 13 % eingeschränkt. Es wird deutlich, dass der Organismus in der Lage ist pathophysiologische Konzentrationen H_2O_2 über einen längeren Zeitraum hinweg zu tolerieren, ohne mit massiven Funktionsverlusten und morphologischen Veränderungen darauf zu reagieren. H_2O_2 in pathophysiologischer Menge führt also nicht zu einer sofortigen Cholestase wie bisher angenommen. Die verminderte Expression der für den Gallefluss notwendigen Membrantransportproteine lässt die Annahme zu, dass oxidativer Stress bei Entzündungen und Autoimmunprozessen eine Cholestase mit unterhalten kann. Außerdem wird in diesem *In-vivo*-Modell bestätigt, dass H_2O_2 eine entscheidende Rolle in der Regulation des Eisenstoffwechsels spielt. Somit wird gezeigt, dass H_2O_2 als Signalmolekül an Entzündungsprozessen teilnimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit diesem Tiermodell die Langzeiteffekte von chronisch-oxidativem Stress betrachtet werden können. Das Modell hat mehrere Vorteile gegenüber bereits existierenden, da erstmals der Einfluss von klar definierten, geringen

Mengen ROS auf die Leberzellfunktionen und die Genregulation *in vivo* unter nicht-toxischen Bedingungen untersucht werden kann. Durch dieses Tiermodell wird es möglich, die Rolle von ROS in der Pathophysiologie der inflammatorischen Lebererkrankungen und die Auswirkung von antioxidativen Therapeutika besser zu verstehen.

