

***UGT1A* Regulation der Leber und des
Verdauungstraktes im humanisierten transgenen
Mausmodell**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Anja Winkler
geboren am 22.04.1983 in Nordhausen

Referent: Prof. Dr. med. Christian Strassburg

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Debener

Tag der Promotion: 10.10.2014

Zusammenfassung

UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs) vermitteln die Detoxifizierung endobiotischer (Hormone, Steroide, Bilirubin, Gallensäuren) und xenobiotischer (Karzinogene, Medikamente) Substanzen durch Konjugation mit Glukuronsäure und ermöglichen so deren biliäre und urinäre Ausscheidung aus dem Körper. Polymorphismen innerhalb des UGT-Genlokus führen zu individuellen Glukuronidierungskapazitäten und beeinflussen somit die Fähigkeit eines Organismus zur Metabolisierung von Medikamenten bzw. zur Eliminierung potentiell toxischer oder karzinogener Substanzen. So resultiert die *UGT1A1*28*-Variante, welche mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom assoziiert ist, in erhöhten Serum-Bilirubin-Konzentrationen, die wiederum das Risiko einer symptomatischen Gallensteinerkrankung steigern (symptomatische *Cholelithiasis*, z.B. obstruktive Cholestase).

Über die Regulation der Glukuronidierung bei cholestatischen Lebererkrankungen liegen bisher nur wenige Daten vor. In der vorliegenden Arbeit konnte im *tgUGT1A*-Mausmodell gezeigt werden, dass eine durch Gallengangsligatur (*bile duct ligation*, BDL) hervorgerufene obstruktive Cholestase zu einer differentiellen Regulation der *UGT1A*-Expression in der Leber und im extrahepatischen Gastrointestinaltrakt von Versuchstieren führt. Dabei wiesen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse, deren Transgen zehn häufig in der Bevölkerung vorkommende Polymorphismen beinhaltet, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Cholestase-induzierten hepatozellulären Schädigungen (Fibrose, Nekrose) auf. Weiterhin wurde nach BDL eine Inhibition des Transkriptionsfaktors Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) beobachtet, für den hinsichtlich der Regulation humaner *UGT1A*-Gene in vergangenen Studien bereits eine Interaktion mit dem oxidativen Stresssensor Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) gezeigt wurde. Eine Stimulation des Gallensäurerezeptor Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) durch den synthetischen FXR-Agonisten GW4064 bei obstruktiver Cholestase führte entgegen den Erwartungen zu keiner weiteren Heraufregulation hepatischer *UGT1A*-Gene bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen, sondern zu einer erhöhten Toxizität. Insgesamt erscheint die Anwendung von GW4064 bei mechanisch bedingten Gallenabflussstörungen daher kontraindiziert und trägt somit gleichzeitig zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung cholestatischer Lebererkrankungen bei (z.B. nor-UDCA, Obeticholsäure).

Die Leberteilektomie bzw. partielle Hepatektomie (PHx) ist ein selektives Operationsverfahren, welches u.a. zur Entfernung maligner Tumore (z.B. HCC, Lebermetastasen bei kolorektalen Karzinomen) angewendet wird. Zur Vermeidung Medikamenten-assoziiierter Nebenwirkungen im Rahmen einer postoperativen Therapie sind Kenntnisse über den Einfluss der Leberregeneration nach PHx auf detoxifizierende Enzyme, wie z.B. die Vertreter der UDP-Glukuronosyltransferasen notwendig.

Durch mRNA-Analyse hepatisch exprimierter *UGT1A*-Gene im *tgUGT1A*-Mausmodell wurde gezeigt, dass die metabolische Funktion der verbliebenen Leber nach einer Leberteilektomie hinsichtlich ihrer Glukuronidierungsleistung noch nicht vollständig wieder hergestellt ist. Daten zur Regulation intestinal exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen während der Leberregeneration nach PHx deuten jedoch darauf hin, dass die Aktivität intestinaler UGTs, vor allem in der frühen postoperativen Phase nach partieller Hepatektomie, möglicherweise eine alternative Strategie für den Metabolismus xeno- und endobiotischer Substanzen darstellen könnte. Insgesamt lassen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur Regulation der Glukuronidierung nach PHx darauf schließen, dass bei der Therapie von Patienten mit einer sich regenerierenden Leber eine Dosisanpassung von Medikamenten erforderlich ist, die durch UDP-Glukuronosyltransferasen metabolisiert werden. Dies gilt insbesondere für homozygote Träger eines *UGT1A*-Haplotypen, der bei 76% der Patienten mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom (*UGT1A1**28) vorkommt und mit einem erhöhten Risiko für Nebenwirkungen bei Pharmakotherapie verbunden ist.

Schlagwörter

- UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs)
- Obstruktive Cholestase
- Leberregeneration

Abstract

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) mediate the detoxification of endobiotic (hormones, steroids, bilirubin, bile acids) and xenobiotic (carcinogens, drugs) substances by conjugation with glucuronic acid, thereby facilitating their biliary and urinary elimination from the body. Polymorphisms within the *UGT* gene locus lead to individual glucuronidation capacities influencing drug metabolism and elimination of potentially toxic or carcinogenic compounds. Thus, the *UGT1A1*28* variant, which is associated with Gilbert's syndrome, results in elevated serum bilirubin levels, that in turn increase the risk for symptomatic gall stone disease (symptomatic *choledocholithiasis*, e.g. obstructive cholestasis).

To date, only limited data exist regarding the regulation of glucuronidation during cholestatic liver diseases. The following study shows that bile duct ligation (BDL) of *tgUGT1A* mice leads to obstructive cholestasis and a differential regulation of *UGT1A* expression in the liver and the extrahepatic gastrointestinal tract of laboratory animals.

TgUGT1A-SNP mice, whose transgene contains ten frequently occurring polymorphisms, show an increased susceptibility for cholestasis-induced hepatocellular damage (fibrosis, necrosis). Moreover, an inhibition of the transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AhR) was observed after bile duct ligation, which has already been shown to interact with the oxidative stress sensor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) regarding the regulation of human *UGT1A* genes. Unexpectedly, a stimulation of the bile acid receptor farnesoid-X-receptor (FXR) by the FXR agonist GW4064 during obstructive cholestasis did not lead to a further upregulation of hepatic *UGT1A* genes in *tgUGT1A-WT* mice, but instead to an increased toxicity. Therefore, the use of GW4064 in biliary obstruction (obstructive cholestasis) seems to be contraindicated, simultaneously contributing to the development of new therapeutic approaches for the treatment of cholestatic liver diseases (norUDCA, obeticholic acid).

Liver resection, or partial hepatectomy (PHx) is a surgical method, which is used for resection of malignant tumors (HCC, liver metastases in colorectal carcinomas i.a.). To prevent drug-induced side effects during postoperative therapy knowledge of the influence of liver regeneration after PHx on detoxifying enzymes like UDP-glucuronosyltransferases is essential. The mRNA analysis of hepatic *UGT1A* genes in

the *tgUGT1A* mouse model showed that after partial hepatectomy the metabolic function of the remaining liver is not fully reconstituted regarding its glucuronidation capacity. However, data on the regulation of intestinal UDP glucuronosyltransferases during liver regeneration after PHx suggest that the activity of intestinal UGTs may represent an alternative strategy for the metabolism of xeno-and endobiotic substances, especially in the early postoperative phase after partial hepatectomy. Overall, the results on the regulation of glucuronidation after PHx obtained in the following thesis indicate that in medical treatment of patients with a regenerating liver a dose reduction in drugs that are metabolized by UDP-glucuronosyltransferases is required. This is particularly true for homozygous carriers of a *UGT1A* haplotype found in 76% of patients with Gilbert's syndrome (*UGT1A1*28*), which is associated with a higher risk for pharmacotherapeutic side effects.

Key words:

- UDP-glucuronosyltransferases (UGTs)
- obstructive cholestasis
- liver regeneration

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Aufbau und Funktion der Leber	1
1.2	UDP-Glukuronosyltransferasen	4
1.3	Transkriptionelle Regulation der <i>UGT1A</i> -Gene	9
1.4	Tiermodelle zum Studium der <i>UGT1A</i> -Gene	17
1.5	Einfluss einer Cholestase auf die enterohepatische Zirkulation von Gallensäuren	19
1.6	Leberregeneration	24
1.7	Zielsetzung	27

2. Material und Methoden

2.1	Material	30
2.1.1	Humanisierte transgene <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mauslinie	30
2.1.2	Versuchstiere	31
2.1.3	Oligonukleotide	32
2.1.4	Enzyme und dNTPs	33
2.1.5	DNA-Marker	33
2.1.6	Antikörper	33
2.1.7	Induzierende Substanzen	34
2.1.8	Kits	34
2.1.9	Puffer und Gebrauchslösungen	35
2.1.10	Chemikalien	35
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	36
2.1.12	Sonstige Materialien	37
2.1.13	Geräte	37
2.1.14	Software	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Behandlung der humanisierten <i>tgUGT1A</i> -Mäuse mit GW4064	39
2.2.2	Anästhesie	39
2.2.3	Gallengangsligatur	39
2.2.4	Leberteileresektion (2/3 Hepatektomie)	40
2.2.5	Biochemische Analyse des Serums	42
2.2.5.1	Bestimmung des Gesamt-Bilirubins	42

2.2.5.2	Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase-Aktivität	43
2.2.5.3	Bestimmung der Alanin-Aminotransferase-Aktivität	44
2.2.6	Histologische Analysen	45
2.2.7	Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	52
2.2.9	RNA-Isolierung	52
2.2.10	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	53
2.2.11	TaqMan PCR	54
2.2.12	Biostatistik	57
3.	Ergebnisse	
3.1	Behandlung humanisierter <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse mit dem FXR-Agonisten GW4064	58
3.1.1	Serumtransaminaseaktivitäten nach GW4064-Behandlung	58
3.1.2	Histologie der Leber nach GW4064-Behandlung	59
3.1.3	Hepatische <i>UGT1A</i> -Genexpression nach GW4064-Behandlung	60
3.1.4	Extrahepatische <i>UGT1A</i> -Genexpression nach GW4064-Behandlung	61
3.1.5	Hepatische Cytokin-Expression nach GW4064-Behandlung	63
3.1.6	Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren nach GW4064-Behandlung	63
3.2	Gallengangsligatur (BDL) in humanisierten transgenen <i>UGT1A</i> -Mäusen	64
3.2.1	Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel bei Cholestase	64
3.2.2	Histologie der Leber bei Cholestase	65
3.2.3	Hepatische <i>UGT1A</i> -Expression bei Cholestase	68
3.2.4	Extrahepatische <i>UGT1A</i> -Expression bei Cholestase	70
3.2.5	Hepatische Cytokin-Expression bei Cholestase	72
3.2.6	Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren bei Cholestase	73
3.3	GW4064-Behandlung humanisierter <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse bei Cholestase	74
3.3.1	Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	74
3.3.2	Histologie der Leber nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	75
3.3.3	Hepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach GW4064-Behandlung	78

bei Cholestase	
3.3.4 Extrahepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	79
3.3.5 Hepatische Cytokin-Expression nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	82
3.3.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	82
3.4 TCDD-Behandlung humanisierter <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse bei Cholestase	84
3.4.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	84
3.4.2 Histologie der Leber nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	85
3.4.3 Hepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	88
3.4.4 Extrahepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	89
3.4.5 Hepatische Cytokin-Expression nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	91
3.4.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	91
3.5 Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx) in humanisierten transgenen <i>UGT1A</i> -Mäusen	93
3.5.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel während der Leberregeneration nach PHx	93
3.5.2 Histologie der Leber während der Leberregeneration nach PHx	94
3.5.3 Hepatische <i>UGT1A</i> -Expression während der Leberregeneration nach PHx	97
3.5.4 Extrahepatische <i>UGT1A</i> -Expression während der Leberregeneration nach PHx	99
3.5.5 Hepatische Cytokin-Expression während der Leberregeneration nach PHx	101
3.5.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren während der Leberregeneration nach PHx	102
3.5.7 Extrahepatische Expression von Transkriptionsfaktoren während	102

der Leberregeneration nach PHx	
3.6 GW4064-Behandlung humanisierter <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse während der Leberregeneration (PHx72h)	104
3.6.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	104
3.6.2 Histologie der Leber nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	105
3.6.3 Hepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	108
3.6.4 Extrahepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	109
3.7 TCDD-Behandlung humanisierter <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse während der Leberregeneration (PHx72h)	111
3.7.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	111
3.7.2 Histologie der Leber nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	112
3.7.3 Hepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	115
3.7.4 Extrahepatische <i>UGT1A</i> -Expression nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)	116
4. Diskussion	
4.1 Differentielle und gewebespezifische Regulation der hepatischen und extrahepatischen intestinalen <i>UGT1A</i> -Expression im humanisierten <i>tgUGT1A</i> -Mausmodell durch den FXR-Agonisten GW4064	118
4.2. Differentielle und gewebespezifische Regulation der Glukuronidierung bei obstruktiver Cholestase (BDL) im <i>htgUGT1A</i> -Mausmodell und Modulation durch FXR- und AhR-Agonisten	121
4.2.1. Toxizität des FXR-Agonisten GW4064 bei Cholestase im <i>tgUGT1A</i> -Mausmodell	125
4.2.2. AhR-vermittelte Modulation der Glukuronidierung bei obstruktiver Cholestase im <i>htgUGT1A</i> -Mausmodell	129

4.3.	Regulation der Glukuronidierung während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie im <i>tgUGT1A</i> Mausmodell und Modulation durch FXR- und AhR-Agonisten	131
4.3.1	FXR-vermittelte Modulation der Glukuronidierung während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie im <i>tgUGT1A</i> -Mausmodell	139
4.3.2	AhR-vermittelte Modulation der Glukuronidierung während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie im <i>tgUGT1A</i> -Mausmodell	141
	Literaturverzeichnis	145
	Abbildungsverzeichnis	162
	Tabellenverzeichnis	168
	Lebenslauf	169

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APAP	Acetaminophen
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
AS	Aminosäure
ASBT	<i>Apical sodium-dependent bile acid transporter</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
BA	<i>bile acids</i> (Gallensäuren)
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> (künstliches bakterielles Chromosom)
BDL	<i>bile duct ligation</i> (Gallengangsligatur)
bHLHPAS	<i>basic-Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim</i>
BSEP	<i>Bile salt export pump</i>
bp	Basenpaar
bZIP	<i>basic leucin zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	<i>cholic acid</i> (Cholsäure)
CAR	konstitutiver Androstan-Rezeptor
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CDCA	<i>chenodeoxycholic acid</i> (Chenodeoxycholsäure)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
C/EBP	CCAAT/ Enhancer bindendes Protein
cm	Zentimeter
C-terminal	Carboxyl-terminal

CYP	Cytochrom P450
CYP7A1	Cholesterol-7 α -Hydroxylase
DAB	Diaminobenzidin
DBP	<i>albumin promoter D-site binding protein</i> (Vitamin-D-bindendes Protein)
DCA	<i>deoxycholic acid</i> (Desoxycholsäure)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosintriphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DPD	3,5-Dichlorphenyldiazonium-Tetrafluorborat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
et al	et altera
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAM	6-Carboxyfluorescein(Reporter-Fluorochrom)
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i> (Fibroblasten- Wachstumsfaktor-Rezeptor)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FOX	Forkhead Box
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
FXRE	<i>FXR response element</i> (FXR bindendes Element)
g	Erdbeschleunigung, G-Zahl
g	Gramm

Inhaltsverzeichnis

G	Guanin
G	Gauge-Wert (Außendurchmesser einer Kanüle)
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
h	Stunde
HCA	<i>hyocholic acid</i> (Hyocholsäure)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HE	Hämalaun-Eosin
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HNF	<i>hepatocyte nuclear factor</i> (hepatozyten-spezifischer nukleärer Faktor)
HRP	<i>horse reddish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSP	<i>heat shock protein</i> (Hitzeschock-Protein)
<i>htgUGT1A</i> Mauslinie	humanisierte transgene <i>UGT1A</i> -Mauslinie
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGFBP-1	<i>insulin-like-growth-factor-binding protein 1</i>
IL	Interleukin
ILBP	<i>ileal lipid binding protein</i>
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
Keap-1	Kelch-like ECH-associated protein 1
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LETF	<i>liver enriched transcription factor</i> (leberspezifischer Transkriptionsfaktor)
LCA	<i>lithocholic acid</i> (Lithocholsäure)
LDH	Laktatdehydrogenase
LRH1	Leber-Rezeptor Homolog 1

Inhaltsverzeichnis

LTx	Lebertransplantation
LXR	Leber-X-Rezeptor
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MDH	Malatdehydrogenase
mg	Milligramm
MGB	<i>minor groove binder</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	<i>sodium azide</i> (Natriumazid)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
Nqo	NADP-Chinon-Oxidoreduktase
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2</i>
n.s.	nicht signifikant
NTC	<i>non template control</i> (PCR-Negativkontrolle ohne RNA/DNA)
NTCP	<i>sodium-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
OST	<i>organic solute transporter</i>
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion

Inhaltsverzeichnis

PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHx	Partielle Hepatektomie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKC	Proteinkinase C
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROX	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzel-Nukleotid-Polymorphismus)
sek	Sekunde
SHP	Small Heterodimer Partner
Sing.	Singular
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-rhodamine, Quencher-Fluorochrom
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tBHQ	tert-Butylhydrochinon
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin
Tg	transgen

Inhaltsverzeichnis

TGF- β 1	<i>transforming growth factor-β1</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid
u.a.	unter anderem
U	Enzymeinheit Unit
UDCA	<i>ursodeoxycholic acid</i> (Ursodeoxycholsäure)
UDP	Uridin-5'-Diphosphat
UDP-GA	Uridin-5'-Diphosphat-Glukuronsäure
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VIC	Reporter Fluorochrom
WT	Wildtyp
XAP	X-assoziiertes Protein
XRE	<i>xenobiotic response element</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber repräsentiert das größte Stoffwechselorgan des Organismus und erfüllt als exokrine Drüse zahlreiche Aufgaben. Neben der Produktion lebenswichtiger Eiweißstoffe (Albumin, Gerinnungsfaktoren) und der Regulation des Glukose- und Fettstoffwechsels ist sie wesentlich am Abbau und der Ausscheidung endo- und exogener Substanzen (z.B. Hormone, Medikamente) beteiligt [1]. So wird u.a. das beim Hämoglobin-Abbau entstehende Bilirubin in der Leber durch ein Phase-II-Enzym der Biotransformation, die UDP-Glukuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1), glukuronidiert, so dass es aufgrund seiner dadurch erhöhten Wasserlöslichkeit und der geringeren Toxizität über die Galle in den Darm sezerniert und schließlich mit dem Stuhl ausgeschieden werden kann [2].

Je nach Spezies weist die Leber eine unterschiedlich stark ausgeprägte Aufteilung in Leberlappen auf (*Lobus hepatis sinister*, *Lobus hepatis dexter*, *Lobus quadratus* und *Lobus caudatus*), die anhand der Gefäßversorgung in acht Segmente unterteilt werden und deren submakroskopische morphologische Grundeinheit durch die Leberläppchen (*Lobuli hepatica*) gebildet wird [3]. Diese sind vorwiegend aus in Strängen angeordneten Hepatozyten (Leberzellbalken) aufgebaut, wobei sich an den Eckpunkten zweier benachbarter Leberläppchen die Portalfelder befinden, durch die jeweils ein Ast der Leberarterie (*Arteria interlobularis*), ein Ast der Pfortader (*Vena interlobularis*) und ein Gallengang (*Ductus biliferus interlobularis*) verläuft (Glisson-Trias) [1, 4].

Nach der Vermischung des nährstoffreichen Blutes aus den Ästen der Pfortader und des sauerstoffreichen Blutes aus den arteriellen Ästen erfolgt der Transport zur Zentralvene (*Vena centralis*) über erweiterte Kapillaren zwischen den Hepatozyten, die als Sinusoide bezeichnet werden. Diese sind mit Endothelzellen ausgekleidet, die sich aufgrund sog. *fenestrae* („Fenster“) durch eine erhöhte Permeabilität für größere Moleküle und das Fehlen einer Basallamina (diskontinuierliches Endothel) auszeichnen. Darüber hinaus befinden sich in den Sinusoiden leberspezifische Makrophagen, sog. Kupffer-Zellen, die u.a. am Abbau geschädigter und alter Erythrozyten beteiligt sind [1, 4].

Der eigentliche Stoffaustausch zwischen den Hepatozyten und dem durch das sinusoidale Lumen fließende Blut findet jedoch im Spaltraum zwischen den Leberzellen und den fenestrierten Endothelzellen der Lebersinusoiden, dem Dissé-Raum (nach Josef Dissé), statt (siehe Abb. 1). In diesem befinden sich neben dem Blutplasma sog. Ito-Zellen (hepatische Stellat-Zellen), die Vitamin A enthalten und u.a. der Fettspeicherung dienen [5]. Über die innerhalb der *Lobuli hepatica* (Leberläppchen) verlaufenden Gallen-Kanalikuli (Gallenkapillaren) sowie die kleinen und großen Gallengänge wird die in der Leber synthetisierte Galle schließlich in den Darm befördert [1, 6].

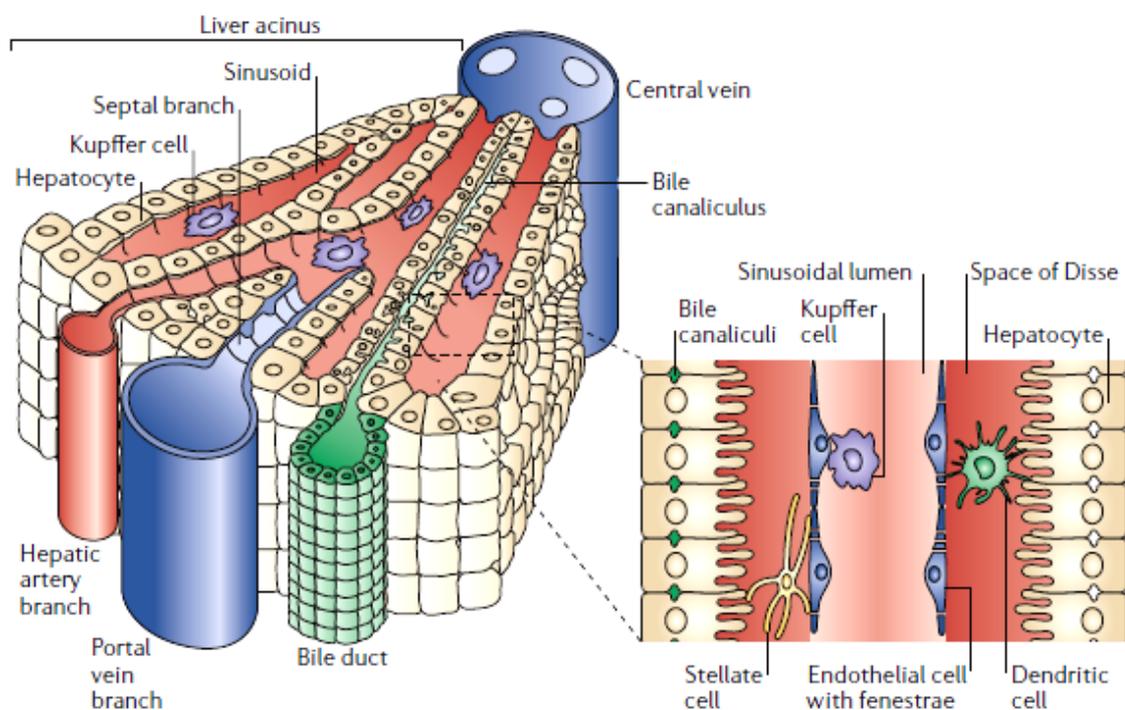


Abb. 1: Dreidimensionale Struktur eines Leberazinus und Aufbau eines Lebersinusoids (Ausschnitt). Aus Adams et al., *Nature Reviews Immunology* 2006 [7].

Neben der Einteilung der Leber in morphologische Untereinheiten (Leberläppchen) kann auch eine Gliederung in funktionell kleinste Einheiten, die sog. Azini (Sing. Azinus) vorgenommen werden, deren mittlere Achse durch die Gefäße der Glisson-Trias gebildet wird [8]. Diese gewährleisten die Versorgung der jeweils benachbarten Leberläppchen mit Sauerstoff und Nährstoffen, welche mit zunehmender Entfernung zur Glisson-Trias von der periportalen Zone in Richtung Zentralvene abnimmt [9, 10, Abb. 2].

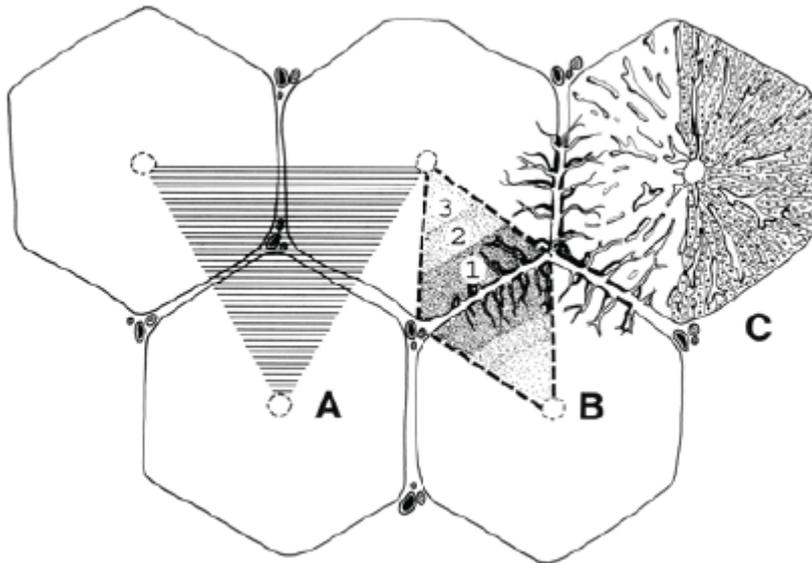


Abb. 2: Gliederung der Leber. Aus *Liebich, H.G., 1999 [11]*. (A) periportale Läppchen mit Lebertrias, (B) Leberazini mit zonaler Gliederung nach Rappaport: 1. Periportale Zone, 2. Midzonale Zone, 3. Perizentrale Zone, (C) klassisches Leberläppchen mit Zentralvene.

Insgesamt erfolgt die Blutversorgung der Leber über zwei verschiedene Wege. Dabei gelangen 75% des Blutes über die Pfortader (*Vena portae*) zur Leber, wodurch u.a. resorbierbare Nährstoffe aus dem Darm aufgenommen werden. Die restlichen 25% werden von den Leberarterien (*Arteria hepatica propria*) erbracht. Die Sauerstoffzufuhr wird zu etwa gleichen Teilen durch das venöse bzw. das arterielle Blut gewährleistet [10].

1.2 UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs)

UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs) sind Enzyme, die in der inneren Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind und dort im Zuge der Phase-II-Biotransformation (Konjugationsreaktionen) lipophile xenobiotische und endobiotische Substanzen durch Konjugation mit UDP-Glukuronsäure in hydrophile und damit biologisch inaktive Glukuronide umwandeln, die anschließend über Galle und Urin ausgeschieden werden können [12].

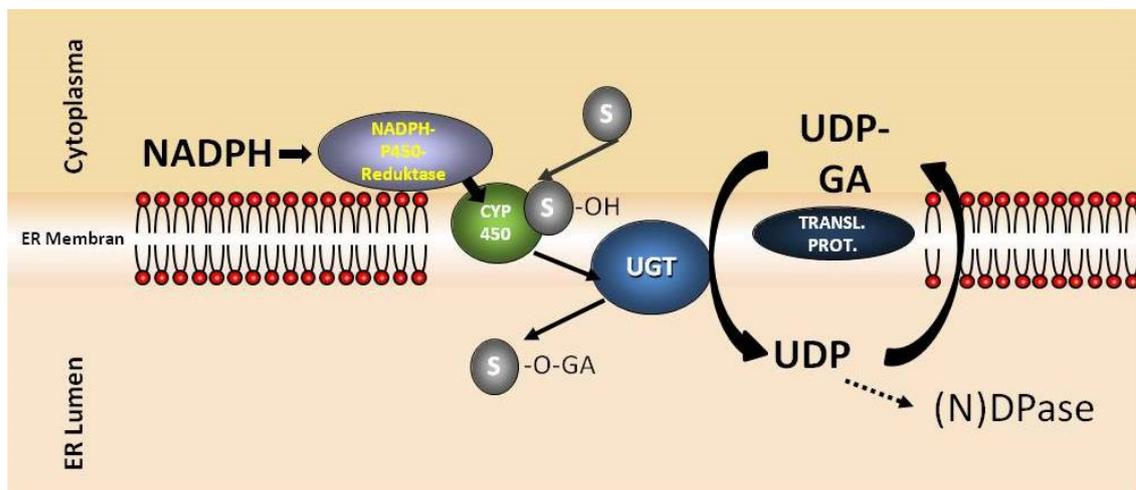


Abb. 3: Lokalisation und Funktion der UDP-Glukuronosyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum (ER). Nach Ehmer, U., Dissertation 2009 [13]. NADPH - Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, CYP450- Cytochrom P450,-OH- Hydroxylgruppe, UGT – Uridin-diphosphat-Glukuronosyltransferase, UDP-GA – Uridin-5'-Diphosphat-Glukuronsäure.

Durch ihre intrazelluläre Lage, in unmittelbarer Nähe des Entstehungsortes von Phase-I-Metaboliten, gehören zu den Substraten der UGTs zahlreiche reaktive Moleküle, die zuvor u.a. von Cytochrom-P450(CYP)-Enzymen (Phase-I-Enzyme der Biotransformation) oxidiert wurden [14]. Dazu zählen neben Nahrungsbestandteilen endogene Metabolite, Hormone, aber auch Medikamente und Umweltkarzinogene [15-18]. Obwohl die Leber häufig als Hauptort der Glukuronidierung angesehen wird, ist inzwischen bekannt, dass zahlreiche Organe zur Gesamt-Glukuronidierungskapazität eines Organismus beitragen [19]. Bisher konnte die Expression von UGTs in Leber, Magen, Ösophagus, Gallengängen, Dünn- und Dickdarm, Lunge, Niere, Hirn und Brustgewebe nachgewiesen werden [16, 20-23].

Genetische Organisation

Die UGT-Superfamilie der Säugetiere umfasst vier UGT-Familien, die für Enzyme kodieren, welche Glykosylgruppen (d.h. Glukose, Glukuronsäure, Xylose, Galaktose etc.) kovalent mit lipophilen Substraten verbinden: UGT1, UGT2, UGT3 und UGT8 [24]. Insgesamt nutzen die Enzyme der UGT1- und UGT2-Familie am effizientesten UDP-Glukuronsäure als Glykosyldonor, obwohl sie auch andere UDP-Zucker, wie z.B. UDP-Glukose und UDP-Xylose, als Zucker-Donor verwenden können [25, 26]. Während *UGT81A* (Galaktose als Zucker-Donor) an der Synthese von Zell-Membran-Komponenten beteiligt ist, spielen die Enzyme der UGT1- und UGT2-Familie eine wichtige Rolle für die Biotransformation endogener und xenobiotischer Substrate [27]. Endobiotische Substrate, wie z.B. Steroide und Gallensäuren, werden vorwiegend von den Enzymen der UGT2-Familie glukuronidiert, deren Gene sich auf Chromosom 4q13 und 4q28 befinden und aus sechs Exons bestehen [28].

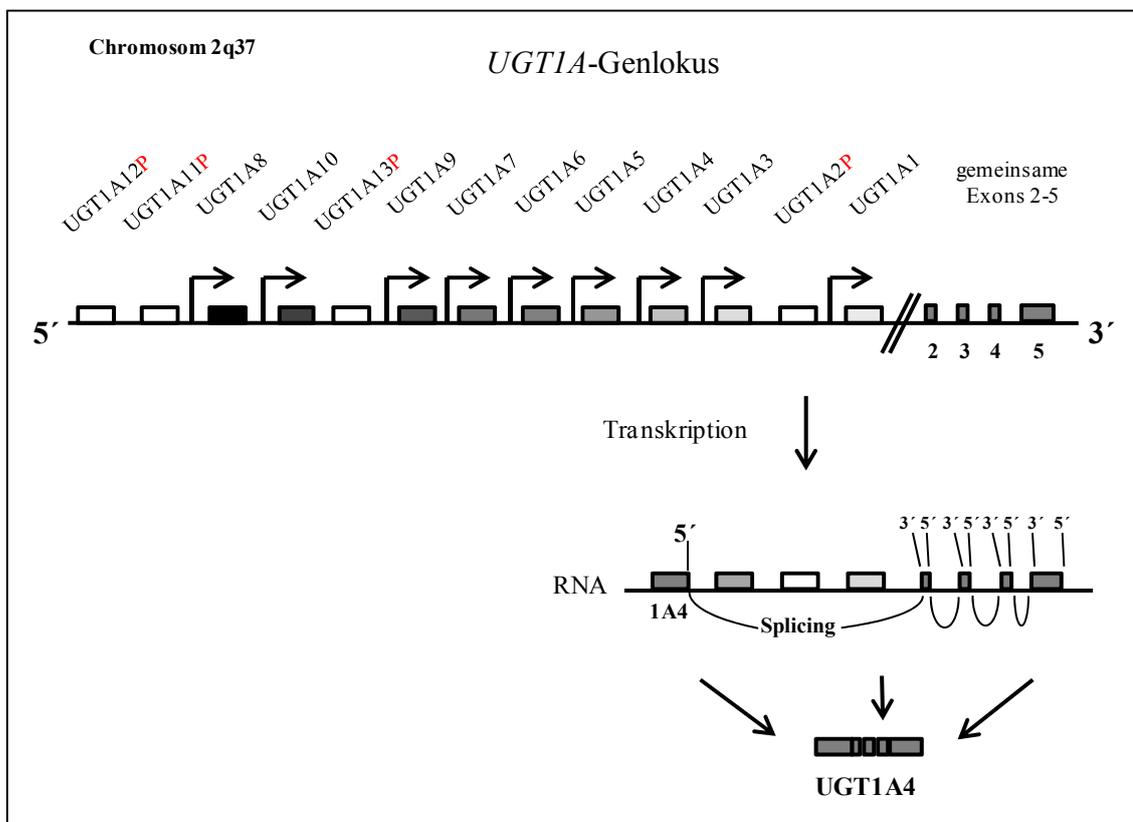


Abb. 4: Genetische Organisation des humanen *UGT1A*-Lokus, schematische Darstellung der Transkription des *UGT1A4*-Gens. Nach Guillemette, C., *The Pharmacogenomics Journal* 2003 [19].

Der auf Chromosom 2q37 lokalisierte humane *UGT1A*-Lokus enthält 13 Gene, wovon neun für funktionelle UGT1A-Proteine kodieren (*UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9*, *UGT1A10*) und vier Pseudogene (*UGT1A2P*, *UGT1A11P*, *UGT1A12P*, *UGT1A13P*) darstellen (siehe Abb. 4).

Durch eine bis mehrere Deletionen im Exon 1 wird bei letzteren die Transkription und Translation eines funktionellen Proteins verhindert [29].

Die nomenklatorische Reihenfolge der *UGT1A*-Gene wurde basierend auf divergenter Evolution festgelegt, wobei die ursprüngliche Absicht darin bestand, die Gene entsprechend ihrer relativen Position zu den Exons 2 bis 5 mit fortlaufenden Ziffern zu benennen. Dabei liegt *UGT1A1* am nächsten und *UGT1A13P* am weitesten von diesen Exons entfernt [19, 24]. Die Sequenzierung des gesamten *UGT1A*-Lokus zu einem späteren Zeitpunkt ergab jedoch, dass die Reihenfolge der ersten Exons, stromaufwärts des Exon *UGT1A7*, von der ursprünglichen Nomenklatur abweicht. Dabei würden auf *UGT1A7* in 3'-5'-Richtung zunächst *UGT1A9* und dann *UGT1A13P*, *UGT1A10*, *UGT1A8*, *UGT1A11P* und *UGT1A12P* folgen. Im Hinblick auf die inzwischen universell akzeptierte Nomenklatur und zur Vermeidung von Verwechslungen in der Literatur sah man jedoch von einer Umbenennung der *UGT1A*-Gene ab.

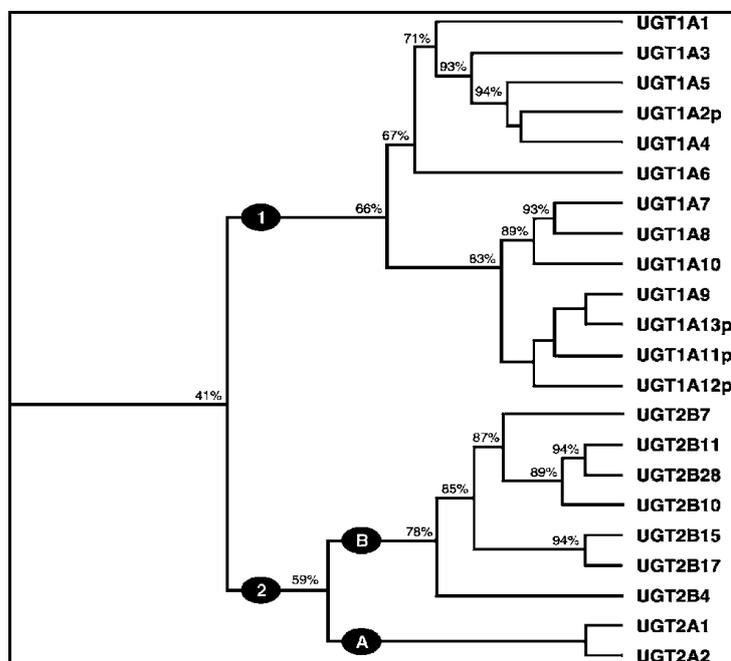


Abb. 5: Phylogenetischer Baum der verschiedenen UGT-Isoenzyme. Aus Guillemette, C., *The Pharmacogenomics Journal* 2003 [19]. Das Dendrogramm zeigt beide UGT-Familien, die weniger als 50 % Homologie aufweisen. Die Prozentzahlen geben die Homologie zwischen zwei Gruppen oder einzelnen Isoenzymen auf Aminosäurelevel wieder. Pseudogene (p) wurden nicht auf Homologie untersucht.

Die hohe Sequenzhomologie zwischen verschiedenen UGTs des 200kbp umfassenden humanen *UGT1A*-Lokus deutet darauf hin, dass dieser sehr wahrscheinlich durch zahlreiche Genduplikationsereignisse entstanden ist [19]. Aufgrund dieser Ähnlichkeit innerhalb der Gensequenzen wurde eine Einteilung der *UGT1A*-Isoformen in Cluster A (*UGT1A2P-UGT1A5*) und Cluster B (*UGT1A7-UGT1A13P*) vorgenommen, wobei eine Sequenzhomologie von 83% bzw. 93% besteht (siehe Abb. 5).

Durch den Mechanismus des „Exon-Sharing“ (siehe Abb. 4), bei dem die gemeinsamen Exons 2 bis 5 mit einem isoformspezifischen Exon 1 kombiniert werden, können alle *UGT1A*-Transkripte und schließlich alle funktionellen *UGT1A*-Proteine gebildet werden. Während die Exons 2 bis 5 den 245 Aminosäure (AS) langen und bei jedem *UGT1A*-Protein identischen C-terminalen Teil kodieren, welcher eine kleine zytoplasmatische Domäne (20 AS), eine hydrophobe Transmembrandomäne (17 AS) sowie die Bindedomäne für UDP-Glukuronsäure im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) umfasst, ist das Exon 1 isoformspezifisch und codiert die 287 ± 2 AS lange, aminoterminal Substratbindedomäne des jeweiligen Enzyms [30-33].

Die Verwendung isoformspezifischer erster Exons trägt daher vermutlich auch entscheidend zur spezifischen Glukuronidierung eines breiten Substratspektrums bei, wohingegen der konstante C-terminale Teil, welcher aus der gemeinsamen Nutzung der Exons 2 bis 5 resultiert, eine stabile Glukuronidierungsleistung gewährleistet.

Substratspezifität und Expression

Obwohl generell eine ausgeprägte Substratüberlappung existiert, haben einzelne UGTs aufgrund der individuellen Substratbindedomänen, die von dem isoformspezifischen Exon 1 kodiert werden, spezifische Substratpräferenzen. Einige Substrate, wie z.B. das Bilirubin, werden ausschließlich von einer einzigen *UGT1A*-Isoform (hier: *UGT1A1*) katalysiert [34], während andere Verbindungen (z.B. Methylumbelliferone) von mehreren *UGT1A*-Isoformen glukuronidiert werden können [35].

Darüber hinaus erfolgt die Expression von UGTs gewebespezifisch, d.h. in jedem Gewebe liegt ein spezifisches Expressionsmuster von *UGT1A*-Isoformen vor (siehe Abb. 6). Entgegen früherer Annahmen, welche die Leber als das zentrale Stoffwechselorgan beschreiben, weiß man inzwischen, dass auch im Gastrointestinaltrakt, dessen metabolisch sehr aktive Mukosa die erste Kontaktfläche

zu Xenobiotika darstellt, eine Vielzahl verschiedener UGT1A-Proteine exprimiert wird. Während *UGT1A7*, *UGT1A8* und *UGT1A10* ausschließlich im extrahepatischen Gastrointestinaltrakt vorkommen, werden die Isoformen *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A6* und *UGT1A9* unter anderem in der Leber exprimiert [16, 22, 36,-37].

Bislang ist die molekulare Organisation und Steuerung des gewebespezifischen Expressionsmusters noch nicht abschließend aufgeklärt. Vermutlich erfolgt die Regulation der einzelnen *UGT1A*-Gene jedoch in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebetyp durch Bindung gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren an Promotoren, die stromaufwärts eines jeden Exon 1 (bei *UGT1A*) liegen und somit für jedes *UGT1A*-Gen spezifisch sind.

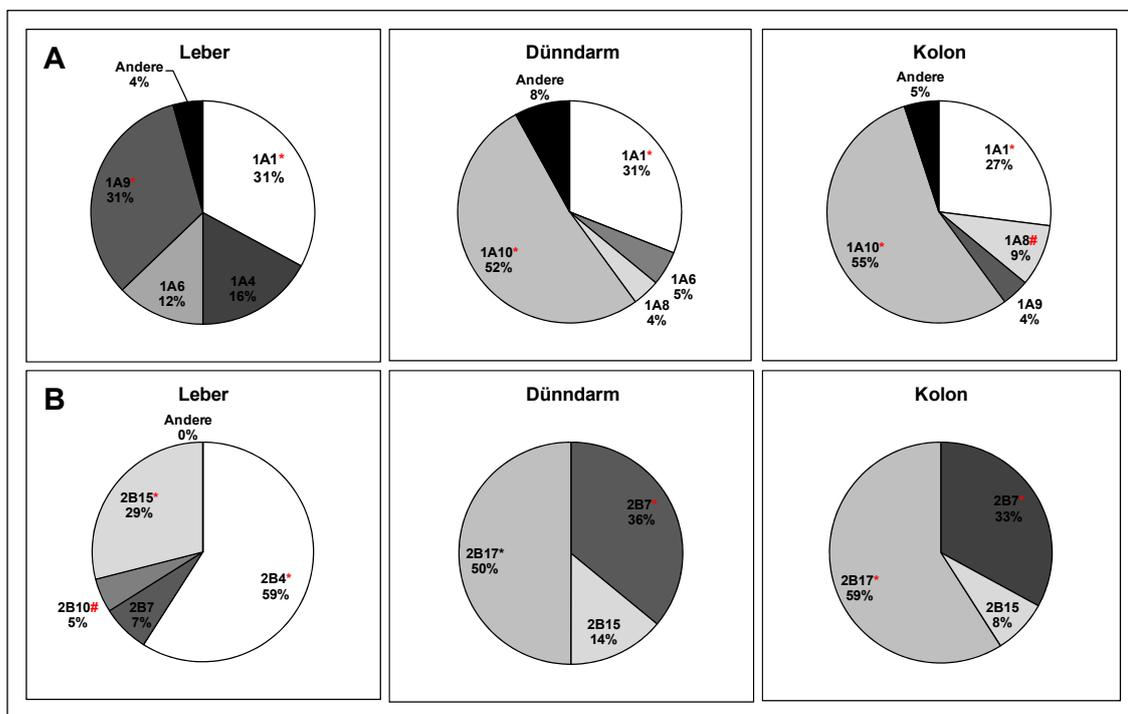


Abb. 6: Relative mRNA-Expressionslevel der humanen *UGT1A* (A) – und *2B* (B) Isoformen in der humanen Leber sowie im humanen Dünndarm und Kolon. Nach Wu et al., *Journal of Pharmacological Sciences* 2011 [38].* Die zwei am häufigsten in den Organen vorkommenden Isoformen. # Einzigartige Isoform der Leber bzw. des Verdauungstraktes.

Sequenzvariabilität des humanen *UGT1A*-Lokus

Die interindividuelle Sequenzvariabilität innerhalb des *UGT1A*-Lokus ist weit verbreitet und wurde offensichtlich während der Evolution konserviert. Durch Genotypisierung des *UGT1A*-Lokus konnten bislang über 100 Polymorphismen in den Promotorregionen und den kodierenden *UGT1A*-Sequenzen identifiziert werden, wobei sich viele miteinander in Kopplungsgleichgewichten befinden und in der allgemeinen Bevölkerung mit Allelfrequenzen von 40 bis 50% vorkommen [39-41].

So resultiert eine Thymin-Adenin(TA)-Insertion in der repetitiven TATA-Box des *UGT1A1*-Promotors, die normalerweise sechs TA-Repeats beinhaltet (A(TA)₆-TAA), u.a. in einer reduzierten Bilirubin-Konjugation. Bei homozygoten Trägern des A(TA)₇TAA-Allels (10% der Gesamtbevölkerung) führt diese zum klinischen Bild des Gilbert-Meulengracht-Syndroms (*UGT1A1**28), wobei eine Serumbilirubin-konzentration >2mg/dl mit einer Gelbfärbung der Haut, Schleimhäute und Skleren (Augenweiß) verbunden ist [42, 43]. Diese Symptome können durch Alkohol, Infektionen und Fasten noch verstärkt werden [43, 44]. Polymorphismen im *UGT1A7*-Gen (*UGT1A7**3) sind darüber hinaus mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko für das kolorektale sowie das hepatozelluläre Karzinom verbunden [45, 46]. Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass viele dieser *UGT1A*-Varianten als Teil eines komplexen *UGT1A*-Haplotyps auftreten [18, 39, 47-49], wobei die Glukuronidierung durch Expression von Proteinen mit verminderter Funktion [39, 45, 50], transkriptionelle Regulation [42, 49, 51-54] oder durch beides beeinflusst wird [55].

Aufgrund ihrer Bedeutung für den Metabolismus von Medikamenten sowie der Disposition bezüglich potentieller Nebenwirkungen und Erkrankungen, sind UGTs ein attraktives Ziel für pharmakogenetische Studien.

1.3 Transkriptionelle Regulation der *UGT1A*-Gene

Die Regulation der UGT-Genexpression ist ein entscheidender Faktor, der sowohl die basalen als auch die dynamischen (Exposition mit Substraten, Induktion) Glukuronidierungsraten in verschiedenen Organen und somit die des gesamten Organismus determiniert [56]. Dabei ist die aus der genetischen Variabilität resultierende interindividuelle Glukuronidierungskapazität wichtig für die Fähigkeit

eines Organismus und seiner metabolisch aktiven Gewebe zum Abbau von Medikamenten bzw. zur Eliminierung potentiell toxischer oder karzinogener Substanzen. Für eine geeignete pharmakologische Therapie und zur Prävention unerwünschter Medikamenten-induzierter Wirkungen sind daher Kenntnisse der genetischen Variationen und regulatorischen Faktoren, welche die Expression der *UGT*-Gene beeinflussen, notwendig. Frühe Studien konzentrierten sich vor allem auf die Regulation durch leberspezifische Transkriptionsfaktoren (*Liver-enriched transcription factors, LETFs*). Diese beinhalten unter anderem die Hepatozyten-spezifischen nukleären Faktoren, HNF-1 α und β , die Forkhead-Box-(FOX)-Proteine A1, A2 und A3, HNF-4 α , HNF-6, die CCAAT/Enhancer bindenden Proteine (C/EBP) α und β sowie das Vitamin-D-bindende Protein (*albumin promotor D-site binding protein, DBP*).

Des Weiteren werden hepatische UGTs durch ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren einschließlich nukleärer Rezeptoren und anderer Faktoren reguliert, die eine Rolle für die oxidative Stressantwort spielen. Im Folgenden werden einige dieser Faktoren genauer beschrieben, da sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit von zentraler Bedeutung sind.

Regulation durch nukleäre Rezeptoren

Farnesoid-X-Rezeptor (FXR)

Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) zählt zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren, zu der auch die Leber-X-Rezeptoren (LXRs), der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR), der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und der Vitamin D-Rezeptor (VDR) gehören [57]. Nach Bindung seines Liganden transloziert FXR in den Zellkern und bindet dort als Heterodimer zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an sogenannte FXR Response Elements (FXREs) im Promotor seiner Zielgene [58].

Im Jahr 1999 wurden Gallensäuren, welche als Endprodukt des hepatischen Cholesteroll-Stoffwechsels entstehen, als natürliche Liganden des FXR identifiziert [59]. Die Gallensäuren-Synthese wird transkriptionell über negative und positive Feedback-Mechanismen reguliert, wobei die Aktivierung von FXR in der Leber über die Induktion des Small Heterodimer Partner (SHP) zur Inhibition des Leber Rezeptor

Homolog 1 (LRH1) und schließlich zur Hemmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes bei der Umwandlung von Cholesterin zu Gallensäuren durch die Cholesterin-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) führt [60, 61].

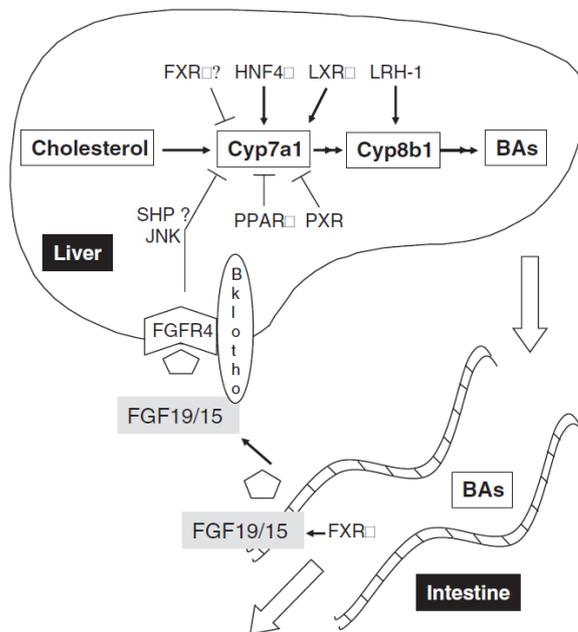


Abb. 7: Negative und positive Feedback-Regulation der für die Kontrolle der Gallensäurebiosynthese verantwortlichen Schlüsselenzyme. Aus Claudel, T. und Trauner, M., *Signaling Pathways in Liver Diseases 2009* [62]. Cholesterin-7 α -Hydroxylase (CYP7A1), Sterol-12 α -Hydroxylase (CYP8B1), Bile acids (BA) - Gallensäuren, Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), Hepatozyten-spezifischer nukleärer Faktor 4 (HNF-4), Leber-X-Rezeptor (LXR), Leber-Rezeptor-Homolog 1 (LRH-1), Fibroblasten-Wachstumsfaktor 15/19 (FGF15/19), Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 4 (FGFR4), Beta-Klotho (β -Klotho), Small Heterodimer Partner (SHP), C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α (PPAR α), Pregnan-X-Rezeptor (PXR), Aktivierung (Pfeil), Inhibition (—|).

Darüber hinaus spielt die intestinale Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors eine bedeutende Rolle für den Gallensäure-Metabolismus. Diese führt im Ileum zur Induktion des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 15 bzw. 19 (FGF15 in Mäusen, FGF19 beim Menschen), welcher über die Portalvene oder lymphatische Gefäße zur Leber gelangt und dort nach Bindung an den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 4 (FGFR4) über einen JNK-abhängigen Signalweg wiederum die Hemmung der CYP7A1-Aktivität bewirkt [62, siehe Abb. 7]. Studien mit Mäusen, die eine Leber- bzw. Darm-spezifische Defizienz des FXR-Rezeptors aufwiesen, legen zudem die Vermutung nahe, dass die FGF15-vermittelte Repression von CYP7A1 gegenüber den

hepatischen negativen Feedback-Mechanismen dominant ist, wodurch eine funktionsfähige Signaltransduktion über die Darm-Leber-Achse Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der Gallensäure-Homöostase wäre [63].

Im Rahmen regenerativer Prozesse (Leberteilresektion, Transplantation) ist sowohl der hepatische als auch der intestinale FXR-Signalweg von zentraler Bedeutung, wobei Letzterer der Vorbeugung von Leberschäden während der Leberregeneration dient [64, 65]. An der transkriptionellen Regulation des Gallensäure-Metabolismus sind neben dem Farnesoid-X-Rezeptor auch andere nukleäre Rezeptoren, wie PXR, CAR und der Vitamin-D-Rezeptor beteiligt, die jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden [66-73]. Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie (*Kay et al.*, 2011) eine Wechselwirkung zwischen FXR und dem Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) beschrieben [74]. Dabei konnte nicht nur ein direkter Einfluss auf die basale hepatische FXR-mRNA-Expression gezeigt werden, sondern auch eine infolge eines erhöhten Deacetylierungsgrades gesteigerte FXR-Aktivität, wodurch die Bildung eines FXR-RXR Heterodimers begünstigt wird. Die resultierende Aktivierung des FXR-Zielgens SHP führt dabei zu einer Konkurrenz mit dem Leber-X-Rezeptor (LXR) um den Dimerisierungspartner RXR α , welche letztlich entscheidend für die transkriptionelle Regulation des Cholesterolverstoffwechsellagernden Enzyms CYP7A1 und somit für die Gallensäure-Biosynthese ist.

Die Umwandlung toxischer Gallensäuren in hydrophobe und weniger toxische Glukuronide, die über die Galle und den Urin ausgeschieden werden können, wird durch UGTs vermittelt, wobei die Glukuronidierung von Chenodeoxycholsäure (CDCA), Lithocholsäure (LCA) und Hyocholsäure (HCA) durch *UGT1A3* katalysiert wird, dessen Expressionsprofil (Leber, Darm) dem des Farnesoid-X-Rezeptors (Leber, Darm, Nieren, Nebennieren) ähnelt [75]. *In vitro* konnte bereits ein cis-aktivierendes FXR-Element im *UGT1A3*-Gen identifiziert werden, dessen Funktionalität von der Präsenz eines Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP; A→G) an Position -204bp abhängig ist [53, Abb. 8].

Die FXR-vermittelte Regulation des *UGT1A3*-Gens stellt darüber hinaus eine biochemische Verknüpfung des endogenen Gallensäure-Metabolismus zum Xenobiotika-Metabolismus dar, da bereits eine Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor(AhR)-vermittelte Regulation des *UGT1A3*-Gens über ein xenobiotisches Response Element (XRE, -35 bis -40 bp) gezeigt werden konnte [53, Abb. 8].

Eine zusätzliche Aktivierung von *UGT1A3* durch Xenobiotika über den AhR könnte möglicherweise zu einer veränderten Glukuronidierung von Gallensäuren, wie CDCA, führen und so auf die transkriptionelle Feedback-Regulation der CDCA-Glukuronidierung Einfluss nehmen.

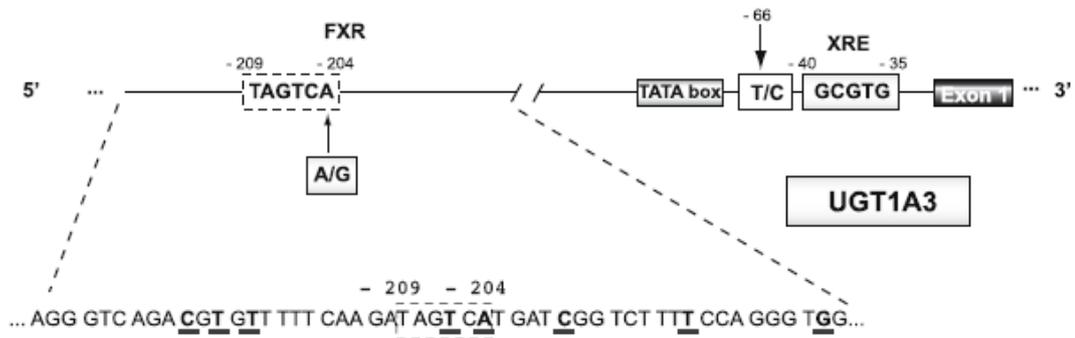


Abb. 8: Graphische Darstellung der 5'→3'-DNA-Sequenz des *UGT1A3*-Gens sowie relative Positionen der SNPs und der xenobiotischen Response Elemente (XREs). Nach *Erichsen et al., Journal of Hepatology 2010 [53]*. Die gestrichelte Box zeigt die Position des FXR-Elementes sowie den darin vorkommenden SNP an Position -209bp (A→G) an, welcher bei 10 % der kaukasischen Bevölkerung vorhanden ist. Ein weiterer SNP kommt an Position -66bp (T→C) vor.

Regulation durch ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren

Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) / Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor nukleärer Translokator (ARNT)

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor der *basic-Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim*-(bHLHPAS-)Familie und spielt eine wichtige Rolle für den Metabolismus von Fremdstoffen (Phase-I- und Phase-II-Enzyme), die Regulation des Zellzyklus (Proliferation / Apoptose), Differenzierung und Inflammation (Karzinogenese) sowie die Entwicklung des Immunsystems [76-81].

In seiner inaktiven Form wird AhR im Zytoplasma durch direkte Interaktion mit dem Hitzeschock-Protein 90 (*heat shock protein 90*, HSP90), dem X-assoziierten Protein 2 (XAP2) und dem HSP90 Co-Chaperon p23 stabilisiert [82]. In Gegenwart seines Agonisten (z.B. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), Benzo(a)pyren oder 3-Methylcholanthren) bildet sich zunächst ein AhR-Ligand-Komplex, welcher nach der Translokation in den Zellkern mit dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor nukleärer Translokator (ARNT) dimerisiert und dadurch an xenobiotische Response Elemente

(XREs) im Promotor seiner Zielgene binden kann [83]. Eine transkriptionelle Regulation durch AhR wurde u.a. intensiv in *CYP450*-Genen untersucht, die wie die Enzyme der UGT-Familie maßgeblich am Metabolismus von Fremdstoffen beteiligt sind [84].

Es gibt jedoch auch Belege für eine transkriptionelle Aktivierung von *UGT1A*-Genen über den AhR-Signalweg, die über XREs innerhalb cis-aktivierender Promotorelemente des jeweiligen *UGT1A*-Gens erfolgt. Eine Xenobiotika-vermittelte Induktion der *UGT1A*-Expression wurde erstmals im Rattenmodell gezeigt, wobei die XRE-Kernsequenz (5'-GCGTG-3) 134bp aufwärts des *UGT1A1*-Promotors identifiziert werden konnte [85-88]. Der humane *UGT1A4*-Promotor, aber auch andere *UGT1A*-Promotoren, weisen in der Nähe des ATG-Codons ein identisches regulatorisches Motiv auf, was auf einen hohen Grad evolutionärer Konservierung des AhR-Signalweges schließen lässt, der nicht nur für verschiedene *UGT1A*-Gene, sondern auch Spezies-übergreifend gilt. So konnte beim Menschen bereits für *UGT1A6* [89, 90] und *UGT1A1* [91, 92] eine AhR-vermittelte Regulation nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden in einer Funktionsstudie am Beispiel des *UGT1A4*-Promotors zwei Polymorphismen aufwärts des ATG-Codons identifiziert (-219 [C>T], -163[G>A]), die bei Trägern dieses Haplotyps (-163A/-219T) zu einer signifikant verringerten Aktivierung durch TCDD im Vergleich zu Trägern des -163G/-219C-Genotyps (Wildtyp) führte [51]. Ein weiterer Hinweis für eine Xenobiotika-abhängige Regulation der Glukuronidierung wurde bei der Analyse des *UGT1A3*-Gens gefunden, für das ebenfalls eine XRE-vermittelte transkriptionelle Regulation über AhR gezeigt werden konnte [93]. Darüber hinaus wurde für einige *UGT1A*-Gene hinsichtlich der transkriptionellen Aktivierung eine Interaktion zwischen dem Aryl-Hydrocarbon Rezeptor und dem Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) beobachtet (siehe nächster Abschnitt).

Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2)

Der Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) ist ein Mitglied der Cap'n Collar Familie von Basic Leucin Zipper (bZip)-Proteinen und ist von zentraler Bedeutung für die Regulation von Genen, die essentiell für die Abwehr von ROS-induziertem oxidativem Stress sind [94, 95]. Letzterer tritt dabei nicht nur nach chirurgischen Eingriffen (z.B. partielle Hepatektomie, siehe 1.6) infolge von

Gewebeverletzungen auf, sondern trägt auch maßgeblich zur Pathogenese zahlreicher Lebererkrankungen bei [96, 97].

In Abwesenheit von Antioxidantien ist der zytoplasmatische Transkriptionsfaktor Nrf2 an seinen Inhibitor Keap1 gebunden. Unter oxidativem Stress oder durch Stimulation mit antioxidativen Substanzen (z.B. tert-Butylhydrochinon [tBHQ], Sulphoraphan) dissoziiert Nrf2 von Keap1, transloziert in den Zellkern und bindet als Heterodimer mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Jun und small Maf an sogenannte Antioxidant Response Elements (ARE) im Promotor potentieller Zielgene [98-101].

Nrf2 spielt jedoch nicht nur eine Schlüsselrolle für die antioxidative Abwehr, sondern ist auch maßgeblich an der Regulation hepatobiliärer Transporter sowie der hepatischen Detoxifikation beteiligt [102]. So konnte in zahlreichen Studien eine erhöhte Suszeptibilität Nrf2-defizienter Mäuse für eine Acetaminophen (APAP)-vermittelte Hepatotoxizität gezeigt werden, die infolge eines veränderten APAP-Metabolismus und einer fehlenden Nrf2-vermittelten Induktion zellulärer Abwehrmechanismen auftritt [103-105]. Darüber hinaus wurde in gallengangsligierten Mäusen (BDL) während der Cholestase eine Nrf2-abhängige Induktion detoxifizierender Enzyme beobachtet (u.a. *NADPH-Chinon-Oxidoreduktase-1*, Nqo-1), die eine protektive Wirkung bei Gallensäuren-induzierten Leberschäden besitzen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach BDL wiesen Nrf2^{-/-}-Mäuse jedoch keine schwerwiegenderen Leberschäden auf, sondern zeigten statt dessen ein geringeres Level hepatischer Gallensäuren, eine signifikante Induktion der nukleären Rezeptoren FXR und SHP sowie eine verringerte Expression der Cytochrom P450-Enzyme *Cyp7a1*, *Cyp8b1* und *Cyp27a1* [106].

Eine Nrf2-vermittelte Regulation detoxifizierender Phase-II-Enzyme der Biotransformation, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchten UDP-Glukuronosyltransferasen zählen, konnte in Mäusen bereits für *Ugt1a1*, *Ugt1a5* und *Ugt1a6* gezeigt werden [107]. Im humanen *UGT1A1*-Promotor wurde darüber hinaus ein funktionelles ARE identifiziert, welches an ein Phenobarbital Response Enhancer Modul an Position -3431 grenzt [108]. Studien des *UGT1A6*-Gens haben außerdem eine AhR-vermittelte Induktion in Abhängigkeit eines benachbarten AREs gezeigt, was auf eine Beteiligung von Nrf2 an der AhR-vermittelten Genregulation hindeutet [90].

Ein Beleg des Crosstalks zwischen Nrf2 und AhR wurde schließlich in Studien mit Nrf2-Knockout-Mäusen (Nrf2^{-/-}) gefunden, welche eine fehlende Aktivierung verschiedener Phase-II-Enzyme, einschließlich *Ugt1a5* und *Ugt1a9*, durch TCDD aufweisen [109]. Des Weiteren konnte für das humane *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Gen

eine koordinierte Regulation zwischen Nrf2 und AhR nachgewiesen werden. Die transkriptionelle Regulation dieser beiden *UGT1A*-Gene ist direkt abhängig von der gleichzeitigen Präsenz von AhR und Nrf2, wobei die AhR-vermittelte Aktivierung des Leber-spezifischen *UGT1A9*-Gens unabhängig von Nrf2 war [110].

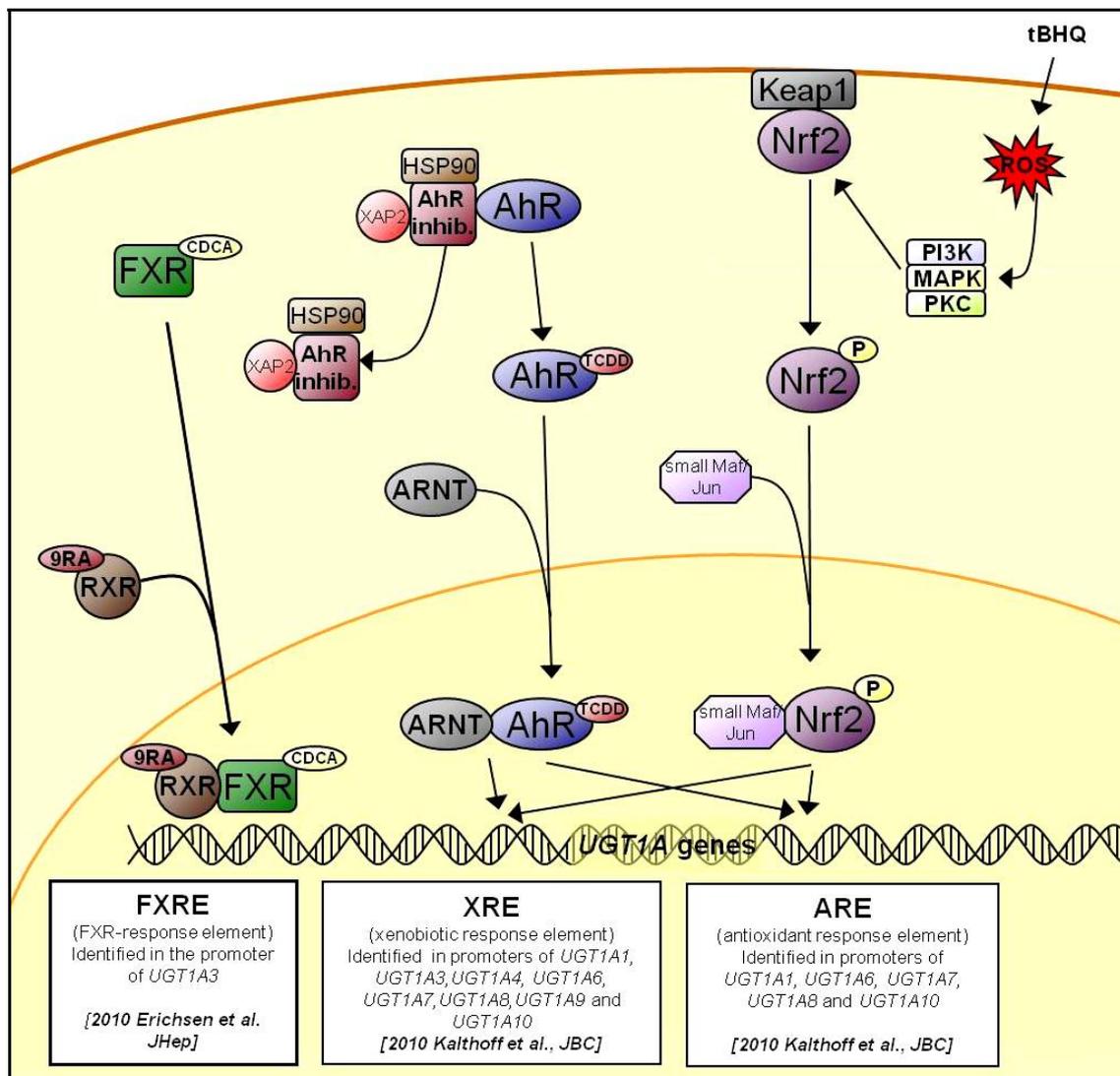


Abb. 9: Transkriptionelle *UGT1A*-Regulation durch FXR, AhR und Nrf2. Nach Strassburg, C.P. und Kalthoff, S., *UDP-Glucuronosyltransferases*, aus Anzenbacher, P. und Zanger, U.M. (Ed.), *Metabolism of drugs and other xenobiotics 2012* [111]. FXR – Farnesoid-X-Rezeptor, CDCA – Chenodeoxycholsäure, RA – Retinsäure, RXR – Retinoid-X-Rezeptor, AhR – Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, XAP-2 – X-assoziiertes Protein 2, HSP90 – Hitzeschock-Protein 90, TCDD – 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin, ARNT – Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, Nrf2 – Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2, Keap-1 – Kelch-like ECH-associated protein 1, PI3K – Phosphoinositid-3-Kinasen, MAPK – Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen, PKC – Proteinkinase C, tBHQ – tert-butyhydrochinon, ROS – reaktive Sauerstoffspezies.

1.4 Tiermodelle zum Studium der *UGT1A*-Gene

Im Jahr 1938 wurde erstmals das Modell der Gunn-Ratte, einem mutierten Stamm der Wistar-Ratte, beschrieben [112]. Der aus der Deletion einer einzelnen Base (Guanosin) resultierende Frameshift führt zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und somit zu einer fehlenden UGT1A1-Aktivität in der Leber dieser Tiere [113, 114]. Diese ist jedoch entscheidend für die Konjugation von Bilirubin, welches als gelbes Abbauprodukt des Häm-Anteils des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin beim Abbau gealterter Erythrozyten entsteht. Im Vergleich zu normalen Tieren ist die Serumkonzentration des unkonjugierten Bilirubins von Gunn-Ratten daher signifikant erhöht (*unkonjugierte Hyperbilirubinämie*). Neben einer fehlenden Aktivität der Bilirubin-UDP-Glukuronosyltransferase (UGT1A1) weisen Gunn-Ratten außerdem ein Defizit hinsichtlich multipler hepatischer Glukuronidierungsaktivitäten auf [115].

Im Jahr 1952 wurde die Gunn-Ratte als Tiermodell für das humane Crigler-Najjar-Syndrom Typ I etabliert, welches als Folge von Mutationen im *UGT1A1*-Gen auftritt [116]. Seitdem hat das Modell nicht nur entscheidend zur biochemischen Charakterisierung der durch Mutationen im *UGT1A*-Lokus verursachten unkonjugierten Hyperbilirubinämie, sondern auch zur Entwicklung therapeutischer Maßnahmen und Behandlungsstrategien für vom Crigler-Najjar-Syndrom Typ I betroffene Patienten beigetragen.

Da die Übertragbarkeit der Experimente mit Gunn-Ratten auf den Menschen jedoch fraglich erschien, wurde 2005 von *Chen et al.* ein humanisiertes transgenes *UGT1A*-Mausmodell (*hTg-UGT1A*) entwickelt, welches den gesamten humanen *UGT1A*-Lokus besitzt [91]. Dabei entspricht das Expressionsmuster der neun *UGT1A*-Gene in etwa dem Expressionsmuster in humanem Gewebe. Mittels Genexpressionsanalyse konnte in diesen *tg-UGT1A*-Mäusen bereits eine Regulation humaner *UGT1A*-Gene durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (PXR, AhR, LXR und PPAR α) gezeigt werden [117, 118]. Als Erweiterung des *Tg-UGT1A*-Mausmodells hat man 2008 durch Ausschalten der murinen Exon 4 Sequenz (*Ugt1a* Genlokus) ein *Ugt1*-Knockout (*Ugt1*^{-/-})-Modell entwickelt. Bei diesen Mäusen kann keine *Ugt1a*-mRNA-Expression gemessen werden, woraus eine komplette Abwesenheit von *Ugt1a*-Enzymen in den Lebermikrosomen resultiert. Neugeborene *Ugt1*^{-/-}-Mäuse weisen daher im Vergleich zu *Ugt1*^{+/-}- oder *Ugt1*-Wildtyp-Mäusen (+/+) ein 40- bis -60-fach erhöhtes Level an unkonjugiertem Bilirubin auf, welches in etwa vergleichbar ist mit dem Bilirubinlevel

bei Patienten mit dem Crigler-Najjar-Syndrom Typ I. Aufgrund der fehlenden Ugt1a-Aktivität versterben $Ugt1^{-/-}$ -Mäuse jedoch innerhalb der ersten zwei Lebenswochen [119]. Des Weiteren führt der Verlust der $Ugt1a$ -Funktion in $Ugt1^{-/-}$ -Mäusen zu einem metabolischen Syndrom, welches als Modell für zukünftige Studien der Toxizität des unkonjugierten Bilirubins sowie dessen Einfluss auf die Crigler-Najjar-Erkrankung im Menschen dienen kann [120].

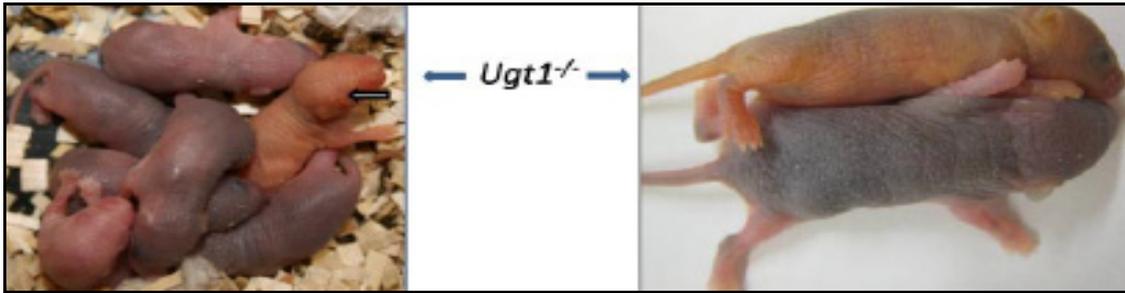


Abb. 10: Phänotyp-Analyse in Assoziation mit der $Ugt1$ -Mutation. Aus Nguyen et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2008 [119].

Schließlich wurden im Jahr 2010 humanisierte Mäuse generiert, welche den humanen $UGT1A$ -Genlocus auf einem $Ugt1$ -Null Background exprimieren [$Tg(UGT1(A1*1))Ugt1(-/-)$], um nach Ausschluss potentieller Interaktionen mit dem murinen $Ugt1a$ -Lokus exaktere Vorhersagen über die humane $UGT1A$ -abhängige Clearance von Medikamenten treffen zu können. Gleichzeitig wurden humanisierte $UGT1A$ -Mäuse entwickelt, die das mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom assoziierte $UGT1A1*28$ -Allel exprimieren [$Tg(UGT1A1*28))Ugt1(-/-)$], welches zu einer um 70% reduzierten Bilirubin-Konjugation führt. Vergleichende pharmakokinetische Untersuchungen in $Tg(UGT1(A1*1))Ugt1(-/-)$ - und $Tg(UGT1(A1*28))Ugt1(-/-)$ -Mäusen konnten zeigen, dass der Promotorpolymorphismus im $UGT1A1$ -Gen ($UGT1A1*28$) u.a. zu einer verringerten Clearance der $UGT1A1$ -Substrate SN-38 (aktiver Irinotecan-Metabolit zur Krebsbehandlung) und Ezetimib (Cholesterolaufnahme-Inhibitor) führt [120]. Mäuse, die genetische $UGT1A$ -Varianten aufweisen, können daher als pharmakokinetisches Modell zur weiteren Analyse des Effekts einer verminderten $UGT1A$ -Expression auf den Stoffwechsel von Medikamenten dienen.

Da bekannt ist, dass die aus einer reduzierten Clearance von Medikamenten resultierende Pharmakotoxizität nicht nur auf einem einzigen Polymorphismus basiert, sondern bedingt ist durch eine Kombination verschiedener $UGT1A$ -Varianten, wurde

2012 in unserer Arbeitsgruppe eine humanisierte transgene *UGT1A-SNP*-Mauslinie und eine korrespondierende *UGT1A-Wildtyp (WT)*-Mauslinie etabliert, die neben dem murinen *Ugt1a*-Lokus den gesamten humanen *UGT1A*-Lokus (bis auf die Gene *UGT1A8* und *UGT1A10*) tragen. Im Fall der *UGT1A-SNP*-Mauslinie sind im humanen *UGT1A*-Lokus jedoch zehn häufig in der Bevölkerung vorkommende Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) enthalten [121-123]. Dieser Haplotyp ist sowohl mit einer geringeren *UGT1A*-mRNA-Expression als auch mit einer verringerten *UGT1A*-Protein-Synthese im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen assoziiert. Darüber hinaus wurde in Induktionsexperimenten mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD), Phenobarbital und Endotoxin (LPS) eine signifikant geringere transkriptionelle Aktivierung von *UGT1A*-Genen in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen beobachtet.

1.5 Einfluss einer Cholestase auf die enterohepatische Zirkulation von Gallensäuren

Gallensäuren werden in der Leber als Endprodukte des Cholesterols-Katabolismus synthetisiert, wobei die Umwandlung von Cholesterols in Gallensäuren über zwei verschiedene Wege, den klassischen Weg und den alternativen ("sauren") Weg, erfolgt (Vgl. Abb. 11). Als Hauptendprodukte der beiden Stoffwechselwege werden die primären Gallensäuren Cholsäure (*Cholic acid*, CA) und Chenodeoxycholsäure (*Chenodeoxycholic acid*, CDCA) gebildet, wobei 75% des Gallensäurepools über den klassischen Weg entstehen. Insgesamt umfasst die Synthese primärer Gallensäuren vier Schritte, die im Wesentlichen durch drei Enzyme vermittelt werden. Auf einen initialen Hydroxylierungsschritt und die Modifikation des Sterolringes folgen die Oxidation und Kürzung der Seitenkette sowie die abschließende Konjugation mit Glycin bzw. Taurin. Während die Cholesterols-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des klassischen Weges darstellt und die Größe des Gallensäurepools beeinflusst, wird der erste Schritt des alternativen Weges durch die Sterols-27-Hydroxylase (CYP27A1) vermittelt. Die Modifikation des Steroidgerüsts erfolgt durch das Einfügen einer Hydroxylgruppe an Position 12 durch die Sterols-12 α -Hydroxylase (CYP8B1), welche über die Bildung von Cholsäure die Zusammensetzung des Gallensäurepools bestimmt. Im Anschluss an die Aktivierung

durch die Gallensäure-CoA-Synthase (BACS) werden neu synthetisierte Gallensäuren (BA \rightarrow BA-CoA) im letzten Schritt durch die Gallensäure-CoA:Aminosäure-N-Acyltransferase (BAT) entweder mit Glycin (Mensch) oder Taurin (Maus) konjugiert [124].

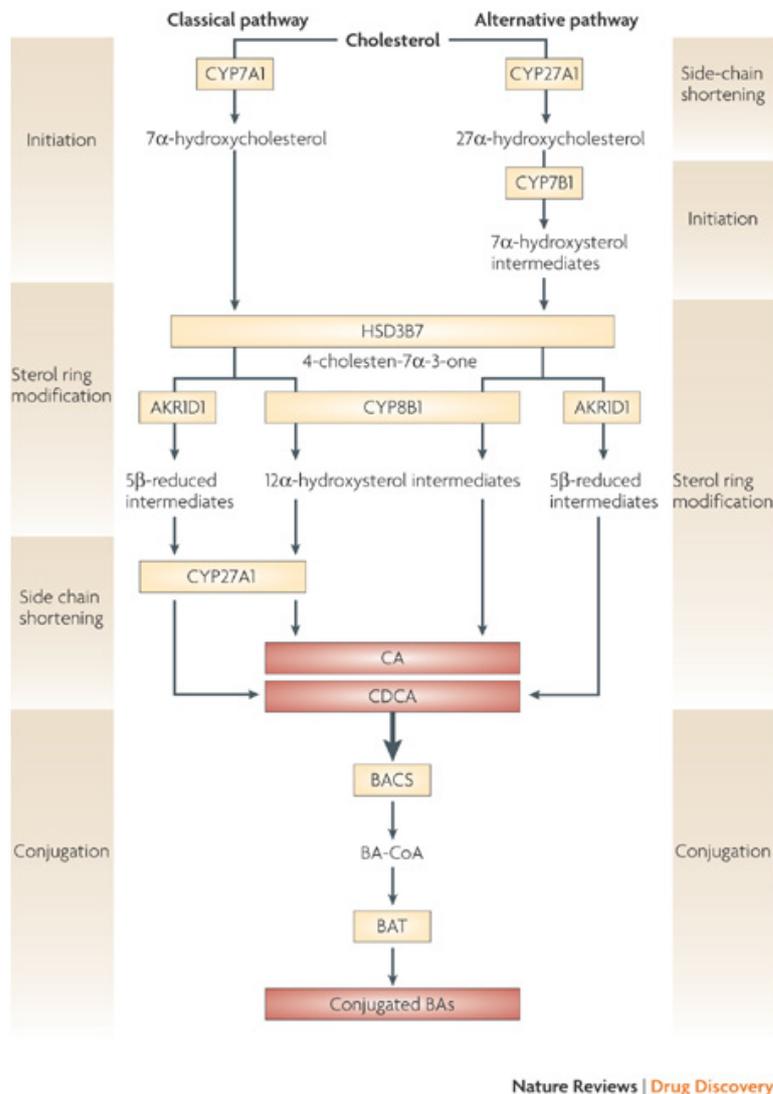


Abb. 11: Umwandlung von Cholesterin über den klassischen bzw. den alternativen („sauren“) Weg. Aus Thomas *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery* 2008 [124]. Cholesterin-7 α -Hydroxylase (CYP7A1), Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1), Sterol-12 α -Hydroxylase (CYP8B1), Gallensäure-CoA-Synthase (BACS), Gallensäure-CoA:Aminosäure-N-Acyltransferase (BAT), Aldo-Keton-Reduktase-Familie 1, Mitglied D1 (AKR1D1), 3 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 7 (HSD3B7).

Bei Nahrungsaufnahme gelangen die in der Leber synthetisierten und in der Gallenblase gespeicherten primären Gallensäuren über die extrahepatischen Gallengänge in den Zwölffingerdarm (*Duodenum*, erster Dünndarm-Abschnitt), wo sie zur Solubilisierung und dem Verdau fettlöslicher Nahrungsbestandteile beitragen.

Aufgrund des pH-Wertes liegen die Gallensäuren im Lumen des Dünndarms in Form von primären konjugierten Gallensalzen vor. Im distalen Abschnitt des Dünndarms (*Ileum*) und im Grimmdarm (*Kolon*, zweiter Dickdarm-Abschnitt) werden sie durch die dort angesiedelte Darmflora über Dekonjugation, Oxidation und Dehydroxylierung teilweise in sekundäre konjugierte Gallensalze (Desoxycholat [DCA], Lithocholat [LCA]) umgewandelt. Der Großteil der Gallensäuren (95 %) wird schließlich durch passive Diffusion und aktiven Transport im terminalen *Ileum* resorbiert und über die Portalvene zurück zur Leber transportiert. Dieser Prozess wird auch als enterohepatische Zirkulation bezeichnet [125, Abb. 12].

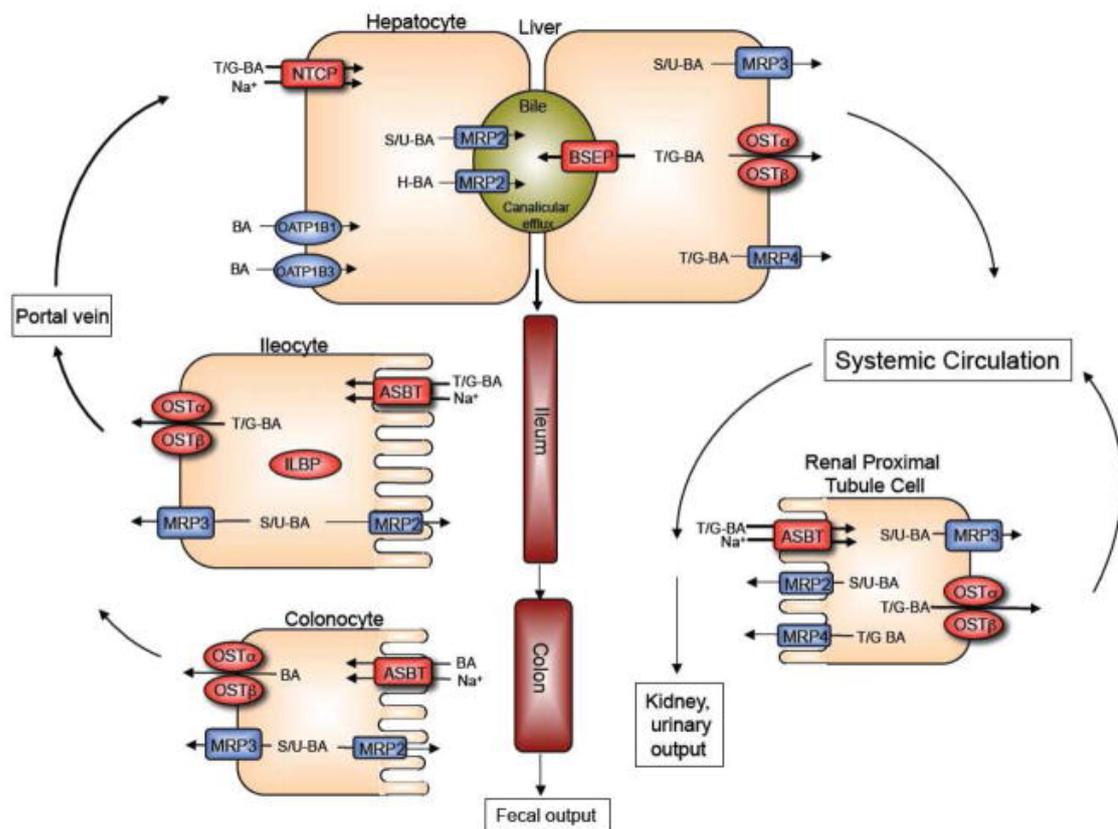


Abb. 12: Enterohepatische Zirkulation der Gallensäuren über Transportproteine in Hepatozyten, Ileozyten (ileale Enterozyten), Kolonozyten und proximale Tubuluszellen der Niere. Aus Dawson *et al.*, *Molecular and Cell Physiology of Lipids 2010* [126]. Bile acids (BA), taurin/glycin-conjugated bile acids (T/G-BA), sulfate/glucuronide-conjugated bile acids (S/U-BA), tetra-hydroxylated bile acids (H-BA), bile salt export pump (BSEP), multidrug resistance proteins (MRPs), sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), organic solute transporters (OSTs), organic anion transporting polypeptides (OATPs), apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT), ileal lipid binding protein (ILBP).

Durch das aufeinander abgestimmte System aus Membran-Transportproteinen in den Hepatozyten der Leber (apikale/sinusoidale Aufnahme, basolateraler/kanalikulärer Efflux von Gallensäuren), den Enterozyten des Gastrointestinaltraktes sowie den proximalen Tubuluszellen der Niere (siehe Abb. 12) wird nicht nur der fäkale und urinäre Verlust von Gallensäuren minimiert, sondern diese potentiell zytotoxischen Detergenzien werden darüber hinaus auch auf die intestinalen und hepatobiliären Kompartimente begrenzt [126]. Dabei wird die sinusoidale Aufnahme der Gallensäuren in die Hepatozyten u.a. durch organische Anionen-transportierende Polypeptide (OATPs) und das Natrium/Taurocholat-cotransportierende Polypeptid (NTCP) vermittelt, wohingegen der Efflux über kanalikuläre Transporter (Multidrug-resistance-Proteine [MRPs], die Gallensalzexportpumpe [BSEP] sowie die Organic Solute Transporter [OSTs]) an der basolateralen Membran gewährleistet wird (siehe Abb. 12).

Unter cholestatischen Bedingungen ist die enterohepatische Zirkulation von Gallensäuren (Gallefluss) gestört, wobei die ätiopathogenetische Einteilung in obstruktive bzw. nicht-obstruktive Cholestasen erfolgt [5, 43, 127].

Während Letztere aus funktionellen Störungen der Gallebildung auf der Ebene der Hepatozyten bzw. Cholangiozyten resultieren können (hepatozelluläre Cholestase: autoimmune, metabolische, infektiöse, genetische Funktionsstörung, Transmembran-Transport-Systeme), wird die obstruktive Cholestase durch eine Abflussstörung der Galle (z.B. durch Gallensteine) hervorgerufen [128]. Diese führt aufgrund der Retention toxischer Gallensäuren in den Leberzellen zur Induktion von oxidativem Stress, hepatozellulärer Apoptose oder Nekrose sowie zu Inflammation und Fibrose [129, 130]. Darüber hinaus wird durch die Reduktion der Gallensäuren im Darm die bakterielle Translokation im Gastrointestinaltrakt begünstigt, bei der es infolge einer bakteriellen Überwucherung zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität kommt, die zu weiteren infektiösen Komplikationen führen kann [131-134].

In Abhängigkeit von der Ausprägung sowie dem Ausmaß der Abflussbehinderung treten bei cholestatischen Lebererkrankungen neben Ikterus (Gelbsucht, klinisches Leitsymptom), Pruritus (Juckreiz), dunkelbraun gefärbtem Urin und entfärbtem Stuhl, Symptome wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Übelkeit auf. Nach einer Sonographie und dem labordiagnostischen Nachweis der Cholestaseparameter (Bilirubin, Transaminasen [Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT), Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT)], Gamma-Glutamyl-Transferase [γ -GT], Alkalische Phosphatase [AP],

Laktat-Dehydrogenase [LDH]) können jedoch meist zuverlässige Aussagen zur Ursache und Entscheidungen über mögliche Therapien getroffen werden [135].

Als Auslöser für cholestatische Lebererkrankungen werden sowohl Umwelteinflüsse (Ernährung, Medikamente) als auch genetische Faktoren diskutiert [136]. So konnte in zahlreichen Fall-Kontroll-Studien gezeigt werden, dass eine verminderte Glukuronidierung von Bilirubin, wie sie für das Gilbert-Meulengracht-Syndrom beschrieben wurde, mit einem erhöhten Serumbilirubinlevel und einem erhöhten Risiko für Gallensteine assoziiert ist [137, 138]. In den meisten Fällen verursachen Gallensteine keine Beschwerden. Bei etwa 20% der Betroffenen können aus der Gallenblase in den Gallengang eingewanderte Gallensteine (sekundäre Gallensteine, *Cholelithiasis*) jedoch klinische Symptome hervorrufen. Dazu zählen u.a. biliäre Kolliken, Gallenabflussstörungen durch Obstruktion des Gallenganges und in schlimmeren Fällen eine Infektion und Entzündung des Gallenganges (*Cholangitis*) bzw. der Bauchspeicheldrüse (*akute Pankreatitis*) [139, 140].

Die Glukuronidierung von Gallensäuren wird im Wesentlichen durch die *UDP-Glukuronosyltransferase 1A3 (UGT1A3)* vermittelt. In einer aktuellen Studie von *Ehmer et al.* konnte zudem gezeigt werden, dass 91% der homozygoten Gilbert-Patienten (*UGT1A1*28*) gleichzeitig einen homozygoten Promotorpolymorphismus im *UGT1A3*-Gen (*UGT1A3-66 T<C*) aufweisen. Darüber hinaus ist dieser Teil eines komplexen Haplotypen, der bei 76% der für den *UGT1A1*28*-Polymorphismus homozygoten Patienten vorkommt und außerdem die genetischen Varianten *UGT1A6*2a* und *UGT1A7*3* einschließt. In der Gesamtbevölkerung sind ca. 9% homozygote Träger dieses *UGT1A*-Haplotypen [123]. Um zu untersuchen, welchen Einfluss der *UGT1A*-Haplotyp auf das klinische Bild der obstruktiven Cholestase hat, haben wir zwei Mauslinien entwickelt, die den humanen *UGT1A*-Lokus als Transgen entweder in der Wildtyp-Form oder in der SNP-Form, mit dem oben beschriebenen Haplotypen, tragen. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass der *UGT1A*-Haplotyp in der *htgUGT1A-SNP*-Mauslinie zu einer reduzierten Induktion durch Xenobiotika (TCDD, Phenobarbital) führt und somit einen potentiellen Risikofaktor für medikamentöse Therapien darstellt [123].

Im Rahmen überwiegend nicht-obstruktiver Lebererkrankungen, wie der primär biliären Zirrhose (PBC) oder der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), wird bislang die natürliche Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) verabreicht, die zu einer Stimulation der Expression und Funktion hepatobiliärer Transporter führt und

dadurch eine Verbesserung der Cholerese (Gallebildung) sowie eine Reduktion der Cholestaseparameter (ALP, GGT, ALT, AST) bewirkt [141]. Bei immunologisch bedingten Cholangitiden und Hepatitiden, zu denen die PBC zählt, werden unter bestimmten Bedingungen auch Kortikoide verabreicht [141]. Bei obstruktiver Cholestase kommen dagegen eher endoskopische bzw. operative Verfahren zum Einsatz [5]. Da es infolge einer lang andauernden Cholestase neben einer ungenügenden Fettverdauung auch zu Vitamin-Mangelscheinungen kommen kann (vor allem fettlösliche Vitamine (A, D, E, K), sind diätetische Maßnahmen sowie die Einnahme von Vitaminpräparaten ratsam [5]. Im fortgeschrittenen Stadium einer cholestatischen Lebererkrankung liegt schließlich, nach Ausschöpfung konservativer Therapiemöglichkeiten, die Indikation zur Lebertransplantation vor [142].

1.6 Leberregeneration

Die Regenerationsfähigkeit der Leber stellt einen wichtigen Mechanismus zur Sicherung ihrer metabolischen Funktion dar, wobei diese u.a. nach Gewebeverlust als Folge von Vergiftungen, Infektionen, Autoimmunprozessen oder Cholestase beobachtet werden kann [143]. Im Fall chronischer Lebererkrankungen oder permanenter Toxinexposition wird jedoch häufig eine kritische Grenze überschritten, sodass ein Ausgleich des Zellverlustes durch die ohnehin beeinträchtigte Leberregeneration nicht mehr möglich ist. Im weiteren Verlauf kommt es zunächst zum Ersatz des funktionellen Lebergewebes durch fibrotisches Narbengewebe und infolgedessen zu einem andauernden Funktionsverlust, welcher zum chronischen Leberversagen führt [143].

Als Therapie der Wahl für Patienten, die sich im Endstadium einer chronischen Lebererkrankung befinden, gilt seit ihrer Entwicklung in den 60er und 70 Jahren des letzten Jahrhunderts die Lebertransplantation (LTx) [144, 145]. Aufgrund der immer weiter steigenden Differenz zwischen Bedarf und tatsächlich zur Verfügung stehenden postmortalen Spenderorganen gewinnt die Leber-Lebendspende als alternatives Verfahren, sowohl für kindliche als auch für erwachsene Transplantatempfänger, zunehmend an Bedeutung [146, 147]. Eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche Entnahme eines Teils der Leber eines gesunden Spenders und die Transplantation in einen leberkranken Patienten ist dabei der spezielle anatomische Aufbau sowie die Regenerationsfähigkeit der Leber. Neben ihrer enormen Bedeutung

für die Lebertransplantation findet die partielle Hepatektomie (Leberteileresektion) im klinischen Bereich u.a. Anwendung bei der Behandlung von Traumata oder der Resektion von malignen Tumoren, wie z.B. dem hepatozellulären Karzinom (HCC) oder kolorektalen Lebermetastasen (Kolorektales Karzinom, KRK) [148, 149].

Als genetische Risikofaktoren für diese Tumorerkrankungen gelten u.a. Polymorphismen der Karzinogen-metabolisierenden *UDP-Glukuronosyltransferase 1A7*. So ist das *UGT1A7*3*-Allel, das Polymorphismen an den Aminosäurepositionen 129, 131 und 208 aufweist, durch eine geringere Detoxifikationsaktivität gekennzeichnet, woraus eine erhöhte metabolische Prädisposition hinsichtlich einer chemischen Karzinogenese resultiert [45, 46]. Im fortgeschrittenen Stadium eines HCC oder bei Lebermetastasen hängt die Wahl der Therapiemethode (partielle Hepatektomie oder LTx) letztlich von der zusätzlichen Präsenz einer Leberzirrhose und somit auch von der Frage ab, ob nach Resektion noch ausreichend funktionsfähiges Restgewebe vorhanden sein wird.

Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die an der Regeneration des Lebergewebes beteiligt sind sowie die Kenntnis über den Einfluss der partiellen Hepatektomie auf die Expression detoxifizierender UDP-Glukuronosyltransferasen, könnte daher zur Verbesserung der Therapie von chronischen Lebererkrankungen beitragen.

Als anerkanntes experimentelles Modell zum Studium der Leberregeneration gilt heutzutage die Leberteileresektion in Kleintieren, die erstmals 1931 von Higgins und Anderson für Ratten beschrieben wurde [150,151]. Im Gegensatz zu anderen Methoden, bei denen Hepatotoxine (z.B. CCl₄) verwendet werden, ist die partielle Hepatektomie nämlich nicht mit Gewebeverletzung und Inflammation assoziiert und die Initiation des regenerativen Stimulus ist durch Entfernung bestimmter Leberlappen präzise definiert [152]. Infolge eines Gewebeverlustes treten normalerweise mitotisch inaktive Hepatozyten in den Zellzyklus ein und teilen sich bis die ursprüngliche Lebermasse wieder hergestellt ist (kompensatorische Hyperplasie), wobei die regenerative Antwort proportional zur entfernten Lebermasse ist [153, 7]. Des Weiteren ist die Regeneration der Leber im Vergleich zu anderen sich regenerierenden Geweben (Knochenmark, Haut) nicht nur von einer kleinen Gruppe von Vorläufer- bzw. Stammzellen abhängig, sondern wird durch die vorhandenen Zellpopulationen des intakten Organs (Hepatozyten, biliäre Epithelzellen, fenestrierte Endothelzellen, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen, siehe Abb.1) gewährleistet. Durch Proliferation dieser Zellen wird der Verlust des hepatischen Gewebes wieder ausgeglichen, wobei die Hepatozyten als erste

Zellpopulation bereits nach 24 Stunden (Ratte) bzw. 36 Stunden (Maus) proliferieren [152, 7]. Die Dauer des Intervalls zwischen der Hepatektomie und der Initiation der DNA-Synthese der Hepatozyten ist dabei von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Tageslicht [154, 155], Anästhesie [151], Spezies, Fasten [156-159], Alter [160], Geschlecht sowie dem Zustand der Leber abhängig [161]. Während die vollständige Wiederherstellung der Lebermasse und die anschließende Revaskularisierung der Leber beim Menschen circa ein Jahr dauert, ist dieser Prozess bei Ratten und Mäusen bereits nach 5-7 Tagen abgeschlossen [152, 162-164]. Insgesamt verläuft die Leberregeneration jedoch in drei Phasen (1. Initiation, 2. Proliferation, 3. Inhibition), in denen es zur Induktion zahlreicher Gene kommt [165-167, Abb. 13]. Während die Initiations- bzw. „Priming Phase“ (blau) u.a. durch einen Anstieg der proinflammatorischen Cytokine (TNF- α , IL-6) gekennzeichnet ist, sind an der proliferativen Phase (rot), in der die DNA-Synthese der Hepatozyten stattfindet, Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, HGF, TGF- α , FGF-1, FGF-2, VEGF) und Cycline (D, A, E) beteiligt, wobei Letztere eine entscheidende Rolle für die Regulation des Zellzyklus spielen. Der auch als „Terminations-Phase“ bezeichnete, letzte Abschnitt der Leberregeneration wurde im Gegensatz zur Initiations- und Proliferationsphase bislang am wenigsten untersucht. Obwohl einige Studien eine Inhibition der hepatozellulären Proliferation durch TGF- β 1 zeigen konnten [152, 168, 169], scheint die Termination der Leberregeneration jedoch unabhängig vom TGF- β -Signalweg zu sein [170]. Möglicherweise spielen jedoch Aktivine, deren Signaltransduktion ebenfalls über TGF- β -Rezeptoren und sogenannte Smad Proteine erfolgt, eine wichtige Rolle für die Terminierung der Leberregeneration [170-172].

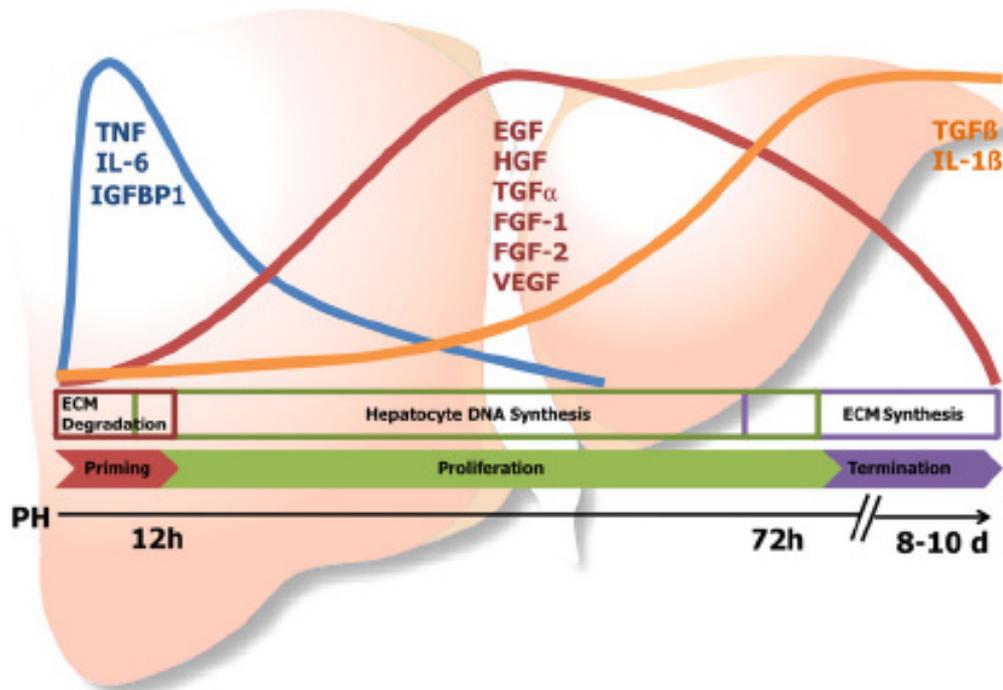


Abb. 13: Schematische Darstellung der an der Leberregeneration beteiligten Faktoren. Aus *Vacca et al., Molecular and Cellular Endocrinology 2013 [165]*. Partial hepatectomy (PH), extracellular matrix (ECM), tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL), insulin-like-growth-factor-binding protein 1 (IGFBP-1), epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor (TGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF).

1.7 Zielsetzung

UGTs sind als Phase II Enzyme der Biotransformation von hoher Bedeutung für die Detoxifikation xeno- und endobiotischer Substanzen und deren Eliminierung über Galle und Urin in Form von hydrophilen und biologisch inaktiven Glukuroniden.

Varianten innerhalb des *UGT1A*-Lokus, die als Teil eines komplexen Haplotypen auftreten sowie die Regulation durch Transkriptionsfaktoren (z.B. FXR, Ahr, Nrf2) können jedoch zu einer veränderten Glukuronidierung gegenüber bestimmten Substanzen führen und erhöhen so die Gefahr potentieller Nebenwirkungen bei medikamentösen Therapien. Darüber hinaus ist bekannt, dass *UGT1A*-Polymorphismen (*UGT1A7*3*) mit karzinogenen Erkrankungen, wie Darmkrebs (*colorectal carcinoma*, CRC) und dem hepatozellulären Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) assoziiert sind.

Die Entgiftung hepatotoxischer Gallensäuren, deren Konzentration bei cholestatischen Lebererkrankungen stark erhöht ist, wird im Wesentlichen durch die *UDP-Glukuronosyltransferase 1A3 (UGT1A3)* vermittelt. *In vitro* (und z.T. auch *in vivo*) konnte bereits eine Induktion einiger *UGT1A*-Isoformen, darunter auch eine Heraufregulation der *UGT1A3*, durch Substanzen wie GW4064 (FXR-Induktor) oder TCDD (XRE-Induktor) gezeigt werden. Es ist jedoch fraglich, welchen Einfluss diese Induktoren im Rahmen einer obstruktiven Cholestase haben.

Als Standardtherapie wird bei Lebererkrankungen mit primären oder sekundären Neoplasien zur Entfernung des krankhaft veränderten Gewebes häufig eine partielle Hepatektomie (Leberteilresektion) angewandt. Welche Auswirkungen diese auf die Glukuronidierungsleistung der Leber eines Individuums, vor allem hinsichtlich des Metabolismus von Medikamenten, hat, und ob diese durch Induktoren (s.o.) moduliert werden kann, ist bisher noch ungeklärt.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich daher folgende Ziele:

1. Da bislang noch keine systematischen Daten zur Regulation der Glukuronidierung im Rahmen cholestatischer Lebererkrankungen veröffentlicht wurden, sollte die hepatische und extrahepatische Expression humaner UDP-Glukuronosyltransferasen bei obstruktiver Cholestase (Gallengangsligatur, *bile duct ligation*, BDL) im humanisierten transgenen *UGT1A*-Mausmodell charakterisiert werden. Dabei sollte u.a. geklärt werden, welchen Einfluss *UGT1A*-Varianten, die als Haplotyp Teil des Transgens der *htgUGT1A-SNP*-Mauslinie sind, auf das klinische Bild der Cholestase haben.
2. Modulation der transkriptionellen Regulation hepatisch und intestinal exprimierter *UGT1A*-Gene während der Cholestase durch FXR- und AhR-Agonisten. Obwohl *in vitro* (und teilweise auch *in vivo*) bereits eine Induzierbarkeit humaner *UGT1A*-Gene durch GW4064 bzw. TCDD nachgewiesen werden konnte, wurde die Wirkung dieser Substanzen auf detoxifizierende UDP-Glukuronosyltransferasen bei obstruktiver Cholestase bisher noch nicht untersucht. Daher sollten humanisierte transgene *UGT1A*-Mäuse nach Gallengangsligatur mit dem FXR-Agonisten GW4064 bzw. dem AhR-Liganden TCDD behandelt und Unterschiede in der Regulation humaner *UGT1A*-Gene in der Leber und im Darm der Versuchstiere aufgezeigt werden.

3. Hinsichtlich der Expression und Aktivität detoxifizierender UDP-Glukuronosyltransferasen während der Leberregeneration nach PHx liegen bislang nur sehr wenige und darüber hinaus kontroverse Daten vor. Daher sollte die Expression hepatischer und extrahepatischer *UGT1A*-Gene während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx) in humanisierten transgenen *UGT1A*-Mäusen untersucht werden.
4. Modulation der transkriptionellen Regulation humaner *UGT1A*-Gene in der Leber und im Darm *tgUGT1A*-Mäuse nach partieller Hepatektomie durch FXR- und AhR-Agonisten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des intestinalen FXR-Signalweges der Aufrechterhaltung der Gallensäurehomöostase während der Leberregeneration dient und dadurch der Entstehung von Leberschäden vorbeugt. Der ligandenaktivierte Transkriptionsfaktor AhR spielt darüber hinaus eine zentrale für die Regulation des Zellzyklus. Daher sollte überprüft werden, ob die intraperitoneale Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach PHx mit GW4064 bzw. TCDD zu einer FXR- bzw. AhR-vermittelten Heraufregulation humaner *UGT1A*-Gene und somit zu einer erhöhten Protektivität gegenüber Leberschäden führt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humanisierte transgene (*htg*) *UGT1A-WT*- und *UGT1A-SNP*-Mauslinie

Zur Untersuchung des Einflusses von Cholestase und Hepatektomie auf die *UGT1A*-mRNA-Expression und für die Induktion der humanen UGTs durch induzierende Substanzen im Mausmodell standen eine humanisierte transgene *UGT1A-WT*- und eine *UGT1A-SNP*-Mauslinie zur Verfügung. Bis auf die Gene *UGT1A8* und *UGT1A10* enthielten beide Mauslinien zusätzlich zum murinen *Ugt1a*-Lokus den gesamten humanen *UGT1A*-Lokus, wobei dieser im Fall der *tgUGT1A-SNP*-Mauslinie zehn häufig in der Bevölkerung vorkommende Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) enthielt (Abb. 4). Als Hintergrundstamm für den humanen *UGT1A*-Lokus wurden C57BL/6J-Mäuse verwendet.

Durch Genkopienanalyse beider Linien mittels quantitativer real-time PCR konnten sechs Genkopien des humanen *UGT1A*-Lokus für die *tgUGT1A-WT*-Maus und fünf Kopien bei der *tgUGT1A-SNP*-Maus nachgewiesen werden. Über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde darüber hinaus gezeigt, dass sich alle Genkopien auf einem Chromosom befinden.

Die aus der Verpaarung *tgUGT1A*-Mäuse mit nicht transgenen C57BL/6J-Mäusen hervorgegangenen Nachkommen wurden schließlich auf das Vorhandensein des *UGT1A3*-Gens untersucht. Positive Mäuse wurden im Alter von acht Wochen behandelt und/oder für die Organentnahme getötet.

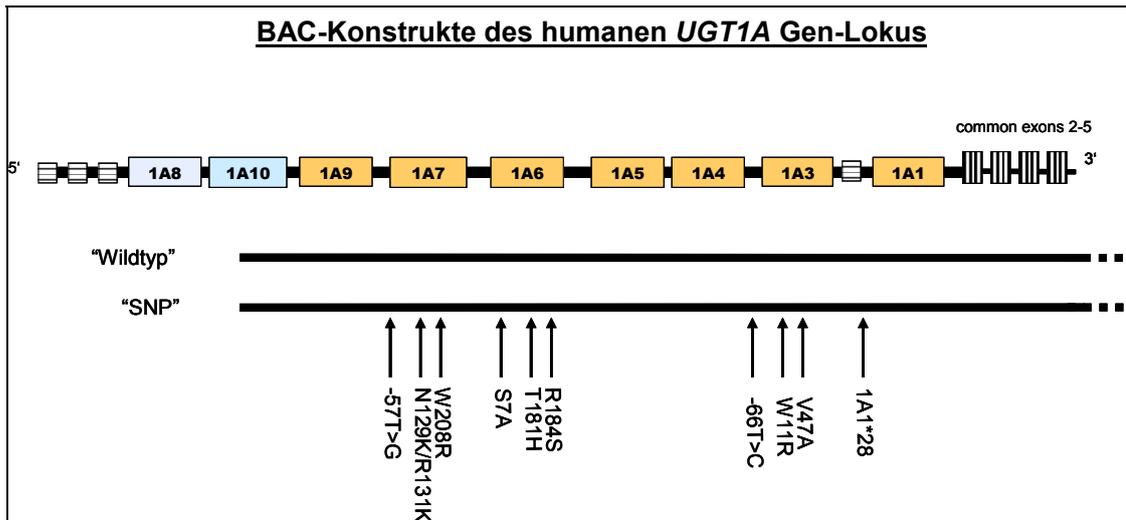


Abb. 14: Schematische Darstellung des humanen *UGT1A*-Lokus und der hergestellten BAC-Konstrukte, die die Gene *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7* und *UGT1A9* enthielten. Das „SNP“-BAC-Konstrukt enthielt im Gegensatz zum „WT“-BAC-Konstrukt einige häufig in der Bevölkerung vorkommende Polymorphismen. Aus Kalthoff, S., *Dissertation 2010* [173]. BAC – Bacterial Artificial Chromosome, künstliches bakterielles Chromosom.

2.1.2 Versuchstiere

Bei allen Versuchen wurden humanisierte transgene *UGT1A*-Mäuse mit einem Gewicht von 20 ± 10 g verwendet. Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River) und wurden bis zu Versuchsbeginn unter zwölfstündigem Tag-Nacht-Zyklus in einem klimatisierten Raum des Zentralen Tierlabors des Institutes für Versuchstierkunde (Direktor: Prof. André Bleich, PhD) der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten.

Bis unmittelbar vor Versuchsbeginn hatten die Tiere freien Zugang zu Tiernahrung (Altromin Haltungsdiet 1324) und Trinkwasser *ad libitum*.

Die Experimente und die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien der Tierschutzgenehmigung (AZ: 33.9-42502-04-07/1248, 33.9-42502-04-12/0947), standen unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Medizinischen Hochschule Hannover und wurden im Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Amplifizierung

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')
Allgen	CCA ATG AAG ACC ATG TTG GGC
UGT1A3	TGT TGA ACA ATA TGT CTT TGG TCT A

Tab. 1: Liste verwendeter Oligonukleotide für Amplifizierung (alle Primer wurden von der Firma MWG bezogen).

Oligonukleotide für Genexpressionsstudien mittels TaqMan PCR

Gen	Primer und Sonden
UGT1A1	Forward: GAATCAACTGCCTTCACCAAAT Revers: AGAGAAAACCACAATTCATGTTCT Sonde: FAM – CTATCCCAGGAATTTGAA – MGB
UGT1A3	Forward: CAGAAGTATGGCAATGTTGAACAATA Revers: GCCTCATTATGTAGTAGCTCCACACA Sonde: FAM – TCTTTGGTCTATCATAGGTC – MGB
UGT1A4	Forward: TTTTCTGCCCTTATGCAAGT Revers: ACAGCCACACGGATGCATAG Sonde: FAM –TCAGAGAGAGGTGTCAGTGGTGGATCTTGT-TAMRA
UGT1A6	Forward: CTTCAATTGGAGGTATCAACTGTAAGAA Revers: AAGAGAAAACCACAATTCATGTTC Sonde: FAM-AGGAAAGACTTGTCTCAGGAATTTGAAGCC-TAMRA
UGT1A7	Forward: GAGGATCAGGACCGGGAGTT Revers: GAAAATGCACTTCGCAATGGT Sonde: VIC – TGGTTTTTGCCGATGCT – MGB
UGT1A9	Forward: AAACCCGTGATGCCCAAC Revers: GGCTTCAAATTCATAGGCAAC Sonde: FAM – TGATCTTCATTGGTGGTATCAACTGCCATC - TAMRA
Actin Maus	Forward: ACGGCCAGGTCATCACTATTG Revers: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG Sonde: FAM-CAACGAGCGGTTCCGATGCCC-MGB

AhR Mm00478932_m1	Sonde: FAM-GAGAGTTCTTGTTACAGGCGCTGAA-NFQ
Nrf2 (Nfe2l2) Mm00477784_m1	Sonde: FAM-CAGTCCCAGCAGGACATGGATTTGA-NFQ
FXR (Nr1h4) Mm01240553_m1	Sonde: FAM- TTCGAAAGAGTGGTATCTCTGATGA-NFQ
IL-6 Mm00446190_m1	Sonde: FAM- TGAGAAAAGAGTTGTGCAATGGCAA-NFQ
TNF- α Mm00443260_g1	Sonde: FAM- CCACGTCGTAGCAAACCACCAAGTG-NFQ

Tab. 2: Liste verwendeter Primer und Sonden für die TaqMan-PCR (alle TAMRA-Sonden und Primer wurden von der Firma MWG, alle MGB-Sonden von Applied Biosystems bezogen).

2.1.4 Enzyme und dNTPs

Enzym	Units (U)/ μ l	Firma
DNase I	100	Invitrogen
DNA-Polymerasen		
BioTherm™ Taq DNA Polymerase	5	Genecraft
SuperScript™ III RT	200	Invitrogen
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		Genecraft

Tab. 3: Liste verwendeter Enzyme.

2.1.5 DNA-Marker

100 bp DNA Ladder (Genecraft)

1 kb DNA Ladder (Genecraft)

2.1.6 Antikörper

Humanes Antigen	Genaue Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Verwendung
Ki-67 (C-terminus)	SP6	Kaninchen	Thermo Scientific	Immunhistochemie (Paraffin)

Tab. 4: Liste verwendeter Antikörper.

2.1.7 Induzierende Substanzen

Substanz	eingesetzte Konzentration	Vehikel
TCDD 2, 3, 7, 8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (Wellington Laboratories)	10 µg/kg/Tag i.p.	90% Corn Oil / 10% DMSO
GW4064 3-(2,6-Dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-chlorostilben-4-yl)oxymethyl-5-isopropylisoxazole (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH)	30 mg/kg/Tag i.p.	90% Corn Oil / 10% DMSO

Tab. 5: Liste der verwendeten Substanzen für die *UGT1A*-Induktion.

2.1.8 Kits

- qPCR MasterMix Plus (Eurogentec)
- SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)
- Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen)
- Kits für Olympus AU 400 (Beckman Coulter)
 - Total Bilirubin (OSR6112)
 - Alanin-Aminotransferase (OSR6007)
 - Aspartat-Aminotransferase (OSR6009)
- ZytoChem-Plus HRP-Polymer-Kit (Zytomed Systems)
- DAB Substrat Kit (Cat. No. DAB530, Zytomed Systems)

2.1.9 Puffer und Gebrauchslösungen

- 0,1 % Natriumazid: 10g NaN₃ in 100 ml Wasser, 1:100 mit Wasser verd.
- Ladepuffer: 50 % Glycerol, 0,2 % Orange-G, Rest 1x TAE
- 4% Paraformaldehyd: 40 g in 1l H₂O
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄
- Puffer für BioTherm Taq DNA Polymerase (Genecraft): 160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8 (at 25°C), 15 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20
- TAE-Puffer 50x: 0,8 M Tris Base, 0,2 M Na-Acetat, 20 mM EDTA, pH 7,
- Citrat-Puffer (10x), pH 6,0, Cat. No ZUC020-500, Firma Zytomed Systems, 1:10 Verdünnung in dH₂O
- Tris-Puffer (20x), Cat. No. ZUC020-2500, 1:20 Verdünnung in dH₂O
- Antikörper-Verdünnungspuffer (Antibody Diluent), gebrauchsfertig, Cat. No. ZUC025-500, Firma Zytomed Systems

2.1.10 Chemikalien

Agarose NEEO, ROTIGAROSE[®] (Roth)

Ammoniumpersulfat (APS)

Aqua Spüllösung (Delta Select)

Chloroform (J.T. Baker)

DEPC-treated Water (Ambion)

DirectPCR Lysis Reagenz (Viagen)

Direct Red 80 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Eosin G, gelblich C.I. 45380 (Merck KGaA)

Ethanol 99.9% (J.T. Baker)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Fluoromount, wässriges Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Isofluran Baxter (Baxter)

Isopropanol (J.T. Baker)

Mayer's Hämalaunlösung (Merck KGaA)

Methanol (J.T. Baker)

Natrium-Azid ≥99,0 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Pikrinsäurelösung (1,3 %, wässrig, gesättigt) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Proteinase K (Qiagen)
Roti-Histokit, harzhaltiges Medium (Roth)
TRIzol[®] Reagent (Invitrogen)
Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %, Merck KGaA)
Xylol (J.T.Baker)

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

8er SoftStrips 0,2 ml (Biozym)
chirurgisches Nahtmaterial (Ethicon Mersilene 4-0, Fs-2, 45 cm; Johnson&Johnson)
Deckgläschen (VWR)
Einbettkassetten Rotilabo (Roth)
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml (Sarstedt)
Färbeküvetten aus Glas
Greinerröhrchen (Greiner Bio-One)
Krankenunterlage MoliNea[®] Plus L (IVF Hartmann AG)
Mikro-Einmalpipette (Minicaps[®], Hirschmann Laborgeräte)
Microtome Blades (Feather, Type S35)
Objektträger SuperFrost[®] (Adhäsions-Objektträger, Menzel-Gläser, Thermo Scientific)
Objektträger (geschnitten, Mattrand, Thermo Scientific)
Objektträgerkorb
PCR-Platten twin.tec. 96 (Eppendorf)
Plastikküvetten für Photometer (Sarstedt)
Plastikpetrischalen (Sarstedt)
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Sarstedt)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Sarstedt)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl mit Filter (StarLab)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Sarstedt)
Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman)

2.1.12 Sonstige Materialien

Anesthesia Induction Chamber (Xenogen Corporation)

Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe mit 5 % Dexpanthenol (Bayer Vital GmbH)

Isofluranspritze (TSE Systems)

Inhalationsmaske (TSE Systems)

Gelelektrophoresekammern (Bio-Rad, SCIE-PLAS)

Narkosegas-Absaugschlauch (Dräger Medical Deutschland GmbH)

2.13 Geräte

ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Anesthesia Unit Univentor 400 (TSE Systems)

Durchlichtmikroskop (Nikon TMS)

Färbeautomat „Sakura Tissue-Tek Prisma E2S“ (Sakura Finetek USA, Inc.)

Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60)

Gewebe-Infiltrationsautomat (TP1020 Leica)

Heizblock für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Thermomixer 5436)

Kamera für Fluoreszenzmikroskop (Olympus XC50)

Kühlplatte für Einbettenschälchen und Paraffinblöcke (Medites TES 99.410)

Kühlzentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, 5403)

Lamina Flow (Integra Biosciences)

Magnetrührer/Heizplatte (Heidolph, ME 3001)

Medizinisches Analysegerät (Olympus AU 400, Olympus Diagnostica GmbH)

Mikrotom (Microm HM335E)

Paraffin Dispenser (Kunz instruments)

Paraffin Section Mounting Bath (Electrothermal MH8513)

Paraffin-Streckbad (GFL mbH)

PCR-Maschinen (Biometra-T personal; Perkin Elmer- GeneAmp PCR Systems 2400;

Stratagene-Robocycler Gradient 96)

pH-Meter (Calimatic, 766)

Photometer (Pharmacia Biotech, Ultraspec[®]3000)

Power Supply für Agarose-Gelelektrophorese (Consort, E835)

Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik)

UV-Lichtanlage zur Geldokumentation (Bachofer)

Vortexer (Heidolph)

Zentrifuge für 0,5 ml und 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, 5415D)

2.1.14 Software

ABI Prism[®] Version 2005 SDS 1.2.3, Applied Biosystems

Cell D Software, Olympus

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung der humanisierten *tgUGT1A*-Mäuse mit GW4064

Die Behandlung der humanisierten transgenen *UGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse mit dem FXR-Agonisten GW4064 (30 mg/kg/Tag, 10 ml/kg KGW) erfolgte durch intraperitoneale Injektion unter Verwendung einer 23-25G Kanüle (gemäß Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren, GV-SOLAS, Auflage: August 2012).

2.2.2 Anästhesie

Für die folgenden operativen Eingriffe (Sham-Operation, Gallengangsligatur, Hepatektomie) wurden die Versuchstiere narkotisiert. Die Anästhesie erfolgte mit der Univentor 400[®] Anesthesia Unit, wobei die Tiere durch ein Isofluran-Luft-Gemisch zunächst in einer Narkosekammer (Anteil Isofluran: 4 %) und anschließend weiter über eine Inhalationsmaske (Anteil Isofluran: 2 %) anästhesiert wurden. Die Durchflussrate betrug dabei jeweils 200 ml/min.

Aufgrund des fehlenden Lidschlussreflexes der Versuchstiere während der Narkose wurde zum Schutz der Augen Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe mit 5 % Dexpanthenol verwendet.

2.2.3 Gallengangsligatur

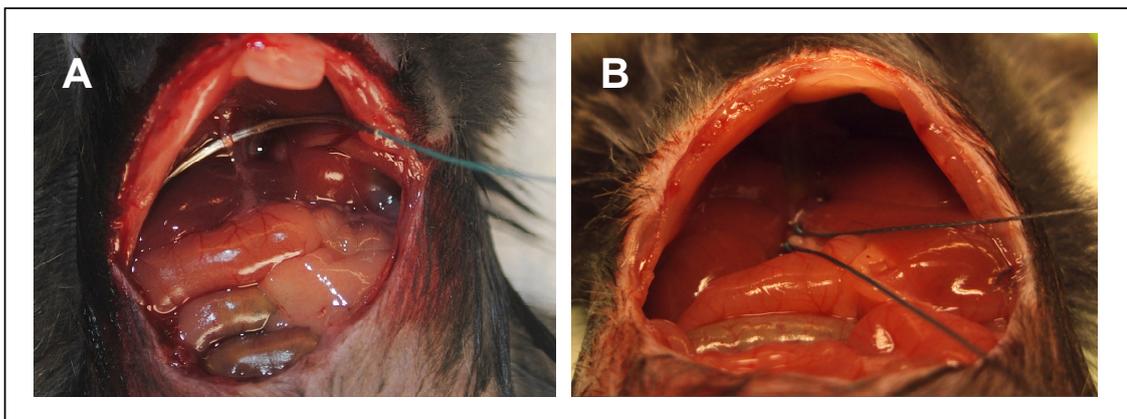


Abb. 15: Ligatur des Gallenganges.

Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Ethanol wurden die Versuchstiere auf einer sterilen Unterlage fixiert.

Bei der Gallengangsligatur wird die Peritonealhöhle ausgehend vom *Manubrium sterni* zunächst durch einen horizontalen Schnitt durch die Epidermis, gefolgt von einem Schnitt durch die abdominale Muskulatur, eröffnet. Anschließend werden die einzelnen Leberlappen vorsichtig beiseite geschoben, um den Gallengang frei zu legen. Der Gallengang wird daraufhin vorsichtig mit einer gebogenen Nadel isoliert und proximal sowie distal mit Nahtmaterial ligiert. Die abdominale Muskulatur sowie die Außenhaut werden im Anschluss an den operativen Eingriff mit einer fortlaufenden Naht geschlossen. Nach Beendigung der Narkose werden die Versuchstiere unter einem Infrarotstrahler bis zum Erwachen weiter beobachtet.

2.2.4 Leberteileresektion (2/3 Hepatektomie)

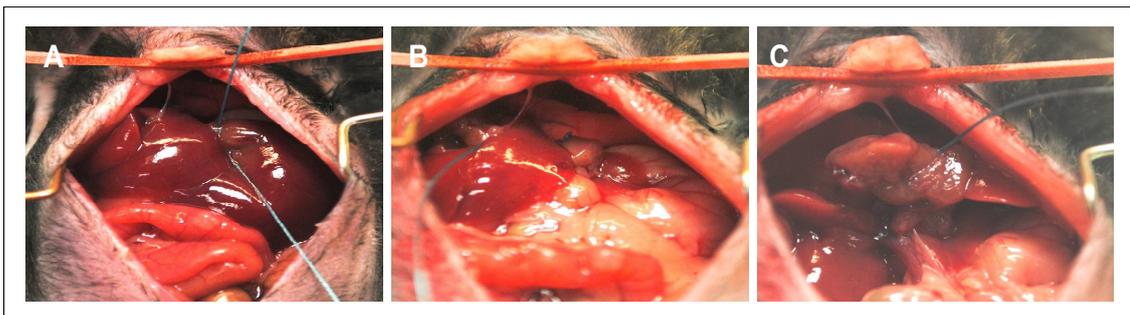


Abb. 16 a-c: Leberteileresektion (partielle Hepatektomie) des linken lateralen und des medianen Leberlappens.

Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Ethanol wurden die Versuchstiere auf einem mit einer sterilen Unterlage umwickelten Styropor-Deckel fixiert.

Bei der Hepatektomie wird zunächst die Bauchhöhle durch eine mediane Laparotomie bis zum *Manubrium sterni* eröffnet und die Leber exponiert. Durch vorsichtiges Herunterdrücken des medianen Leberlappens mit einem Saline-getränkten Wattestäbchen wird daraufhin das *Ligamentum falciforme* mit einer chirurgischen Schere durchtrennt. Dann wird unter Verwendung eines Saline-getränkten Wattestäbchens der linke laterale Leberlappen angehoben, um an der Basis (in der Nähe des Leberhilums) mit chirurgischem Nahtmaterial zwei Knoten zu setzen. Infolge des unterbrochenen Blutausstoms aus dem Leberlappen ändert sich dessen Färbung im Vergleich zu vorher zu Dunkelrot. Mit einer chirurgischen Schere wird der soeben abgebundene laterale Leberlappen direkt über den gesetzten Knoten entfernt.

Eventuelle Blutungen sollten hierbei nur vom resizierten Leberlappen ausgehen. Die zweite Resektion betrifft den medianen Leberlappen, bei dem ebenso wie beim linken lateralen Leberlappen mit chirurgischem Nahtmaterial zwei Knoten an der Basis gesetzt werden. Diese sollten jedoch nicht zu nah (Mindestabstand 2mm) an der suprahepatischen *Vena cava* gesetzt werden, da dies zu einer venösen Obstruktion (Stenose) und somit zu einem eingeschränkten Blutaustrom aus den verbleibenden Leberlappen (Caudate Lobe [CL]+Right Lobe [RL]) führen kann, welcher letztlich die Ursache für Nekrose und fehlende Regeneration sein kann. Im Gegensatz zur von Mitchell und Willenbring beschriebenen 2/3 Hepatektomie wurde die Gallenblase jedoch intakt gelassen [151].

Im Anschluss an den operativen Eingriff wurden die abdominale Muskulatur sowie die Außenhaut mit einer fortlaufenden Naht geschlossen. Nach Beendigung der Narkose werden die Versuchstiere unter einem Infrarotstrahler bis zum Erwachen weiter beobachtet.

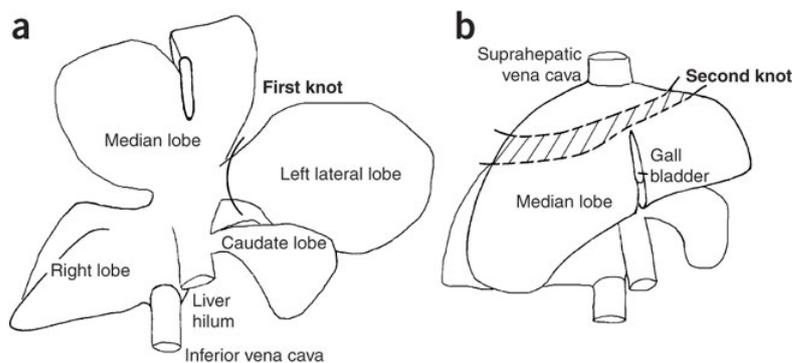


Abb. 17 a+b: 2/3 Hepatektomie. Aus Mitchell, C. und Willenbring, H., *Nature Protocols* 2008 [151].

Nach Ablauf der jeweiligen Versuchsdauer (i.p. Injektion, Sham-Operation, Gallengangsligatur, Hepatektomie) wurde allen Tieren unter Isofluran-Narkose durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer Na-heparinisierten Hämatokrit-Kapillare Blut entnommen. Nach maximalem Blutentzug erfolgte die Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation sowie die Organentnahme für weitere Analysen.

Anschließend wurden Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel gemessen sowie eine histologische Analyse der Leber durchgeführt. Die im Anschluss an die Isolierung der RNA aus Leber, Jejunum und Colon mittels RT-PCR generierte cDNA wurde schließlich in eine *UGT1A*-spezifische quantitative TaqMan-PCR eingesetzt (siehe 2.2.11).

2.2.5 Biochemische Analyse des Serums

Die Gewinnung des Serums erfolgte durch Zentrifugation des heparinisierten Blutes für 10min bei 13000rpm und Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation wurde das Serum (im Überstand) in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die Messung der biochemischen Parameter erfolgte am medizinischen Analysegerät Olympus AU 400 der Firma Olympus in der Abteilung Nephrologie (AG Güler) der Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der Medizinischen Hochschule Hannover. Kurz vor der Messung wurden die Proben aufgetaut und gut durchmischt. Das Gerät wurde täglich kalibriert und vom Hersteller gewartet.

2.2.5.1 Bestimmung des Gesamt-Bilirubins

Bei 80 – 85 % des täglich anfallenden Bilirubins handelt es sich um Abbauprodukte gealterter Erythrozyten, während die übrigen 15-20 % von Abbauprodukten Häm enthaltender Proteine wie etwa Myoglobin, Zytochromen, Katalasen sowie bei ineffizienter Erythropoese aus dem Knochenmark stammen. Eine Reihe von Krankheiten wirken sich auf einen oder mehrere Schritte bei Produktion, Aufnahme, Speicherung, Stoffwechsel oder Ausscheidung von Bilirubin aus. Je nach betreffender Störung tragen unkonjugiertes bzw. konjugiertes Bilirubin oder auch beide Formen entscheidend zur Entstehung einer Hyperbilirubinämie bei.

Die quantitative Bestimmung des Gesamt-Bilirubins in murinem Serum erfolgte durch einen photometrischen Farbttest im medizinischen Analysegerät Olympus AU 400 der Firma Olympus Diagnostica GmbH.

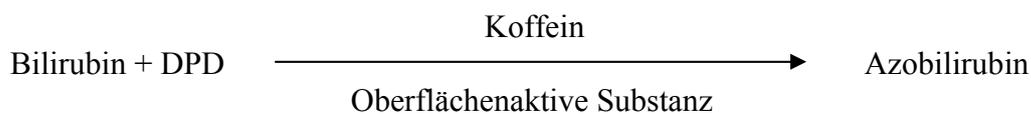
Das Testreagenz setzt sich wie folgt zusammen:

Endkonzentration der Wirkstoffe:

Coffein	2,1 mmol/L
3,5-Dichlorphenyldiazonium-Tetrafluoroborat (DPD)	0,31 mmol/L
Oberflächenaktive Substanz	
Konservierungsmittel	

Testprinzip:

Das stabilisierte Diazoniumsalz 3,5-Dichlorphenyldiazonium-Tetrafluorborat (DPD) bildet bei konjugiertem Bilirubin in direkter Reaktion und bei unkonjugiertem Bilirubin in Gegenwart eines Beschleunigers Azobilirubin. Bei 540nm ist die Absorption proportional zur Gesamtbilirubinkonzentration. Um die endogene Serumstöranfälligkeit zu verringern, wird eine getrennte Vergleichprobe durchgeführt.

Reaktionsprinzip:**2.2.5.2 Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase-Aktivität**

Die AST kommt in vielen verschiedenen Geweben wie Leber, Herzmuskel, Gehirn, Nieren, Lunge, Pankreas, Erythrozyten und Leukozyten vor, wobei sie in Leber und Skelettmuskulatur die höchste Aktivität aufweist. Eine AST-Messung ist zur Diagnose, Differenzierung und Kontrolle von hepatobiliären Erkrankungen, Myokardinfarkt und Skelettmuskelschäden angezeigt. Bei Virushepatitis und Lebererkrankungen mit hepatischer Nekrose steigen AST-Werte oft auf das 20- bis 50-fache an.

Die quantitative Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST) in murinem Serum erfolgte durch einen kinetischen UV-Test im Olympus AU 400.

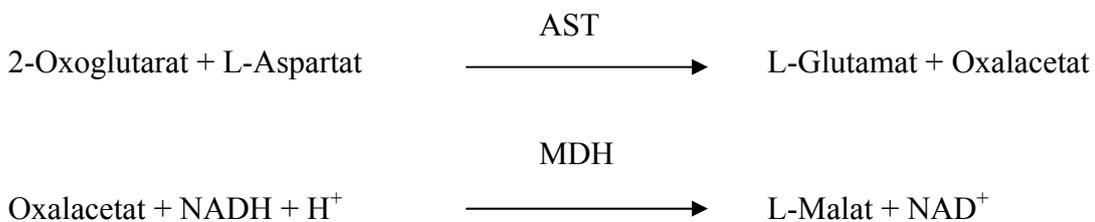
Das Testreagenz setzt sich wie folgt zusammen:

Endkonzentration der Wirkstoffe:

Tris-Puffer pH 7,65 (37°C)	80 mmol/L
L-Aspargat	240 mmol/L
2-Oxoglutarat	12 mmol/L
LDH	≥0,9 kU/L
Malatdehydrogenase (MDH)	≥0,6 kU/L
NADH	0,20 mmol/L
Pyridoxalphosphat (P-5-P)	0,1 mmol/L
Konservierungsmittel	

Testprinzip:

Die Methode basiert auf den Empfehlungen des IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*). Bei dieser Methode katalysiert die Aspartat-Aminotransferase (AST) die Transamination von Aspartat und 2-Oxoglutarat und die Bildung von L-Glutamat und Oxalacetat. Durch das Hinzufügen von Pyridoxalphosphat zur Reaktionsmischung wird die maximale katalytische Aktivität von AST gewährleistet. Das Oxalacetat wird durch Malatdehydrogenase (MDH) zu L-Malat reduziert, während NADH gleichzeitig in NAD^+ umgewandelt wird. Die Extinktionsabnahme aufgrund des NADH-Verbrauchs wird bei 340nm gemessen und ist zur AST-Aktivität der Probe proportional. Endogenes Pyruvat wird während der Inkubationszeit durch die MDH-Reaktion entfernt.

Reaktionsprinzip:**2.2.5.3 Bestimmung der Alanin-Aminotransferase-Aktivität**

Die quantitative Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT) in murinem Serum erfolgt durch einen kinetischen UV-Test im Olympus AU 400.

Das Testreagenz setzt sich wie folgt zusammen:

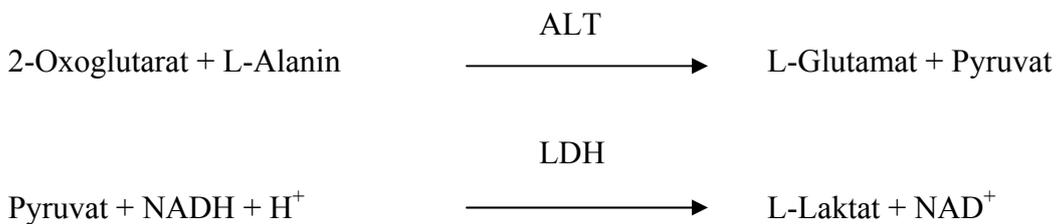
Endkonzentration der Wirkstoffe:

Tris-Puffer pH 7,15 (37°C)	100 mmol/L
L-Alanin	500 mmol/L
2-Oxoglutarat	12 mmol/L
LDH	$\geq 1,8$ kU/L
NADH	0,20 mmol/L
Pyridoxalphosphat (P-5-P)	0,1 mmol/L
Konservierungsmittel	

Testprinzip:

Die Methode basiert auf den Empfehlungen des IFCC.

ALT wandelt die Aminogruppe von Alanin in 2-Oxoglutarat um und bildet Pyruvat und Glutamat. Durch das Hinzufügen von Pyridoxalphosphat zur Reaktionsmischung wird die maximale katalytische Aktivität von ALT gewährleistet. Das Pyruvat geht mit NADH eine durch Laktatdehydrogenase (LDH) katalysierte Reaktion ein und wird zu Laktat und NAD^+ reduziert. Die Extinktionsabnahme aufgrund des NADH-Verbrauchs wird bei 340 nm gemessen und ist zur ALT-Aktivität der Probe proportional. Endogenes Pyruvat wird während der Inkubationszeit entfernt.

Reaktionsprinzip:**2.2.6 Histologische Analyse**

Nach Ablauf der jeweiligen Versuchsdauer wurden den humanisierten transgenen *UGT1A*-Mäusen der obere Teil des rechten Leberlappens (siehe Abb. 17a) zur weiteren histologischen Analyse entnommen. Direkt nach Entnahme wurde dieser zur Fixierung in ein Reaktionsgefäß mit 1ml vierprozentiger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung überführt. Nach 72 Stunden auf einem Schüttler bei 4°C wurde der obere Teil des rechten Leberlappens wieder aus der Fixierungs-Lösung entnommen und mit einem Skalpell vorsichtig halbiert.

Im Anschluss an die eben beschriebene Präparation werden die Leberproben in Rotilabo[®]-Einbettkassetten überführt und zunächst bei 4°C in 0,1-prozentiger Natriumazid-Lösung weiter konserviert.

Die Dehydrierung der Proben erfolgte unter leichtem Schütteln im Gewebe-Infiltrationsautomaten der Firma Leica (TP1020) durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Überführung in Paraffin (Tab. 6). Die Leberproben konnten nun unter Verwendung einer Ausgießstation (Paraffin Dispenser, Kunze Instruments) zu Paraffinblöcken gegossen werden. Mittels eines Mikrotoms (Microm HM335E) wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und aus einem Wasserbad (40 °C) auf Objektträger aufgezogen und anschließend mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

	Chemikalien	Dauer	Funktion
1.	H ₂ O	30 min.	Dehydratisierung
2.	50% Alkohol	~	~
3.	70% Alkohol	~	~
4.	80% Alkohol	~	~
5.	96% Alkohol	~	~
6.	100% Alkohol	~	~
7.	100% Alkohol	~	~
8.	Xylol	~	~
9.	Xylol	~	~
10.	Paraffin	~	~
11.	Paraffin	~	~
12.	Paraffin	~	~

Tab. 6: Protokoll des Gewebeinfiltrationsautomaten TP1020.

Zur Weiterbehandlung der Paraffinschnitte wurden diese in das Zentrale Tierlabor zu Frau Elena Wiebe (Hämalaun-/Eosin) bzw. in das Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover zu Frau Mahtab Taleb Naghsh (Ki-67-Immunhistochemie) gegeben.

Hämalaun-/Eosin-Färbung (HE):

Das Protokoll der Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung wurde im Färbeautomaten „Sakura Tissue-Tek Prisma – Modell Prism-E2S durchgeführt und dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild von Feingewebsschnitten.

Dabei werden im Anschluss an die Rehydratisierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe durch Hämalaun zunächst alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau gefärbt, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun. Erst durch Erhöhen

Lösung A (500 ml): Direct Red 80 (Sigma) 0,5 g in gesättigter wässriger 1,3 % iger Pikrinsäurelösung (Sigma) lösen

Lösung B (1000 ml): mit Essigsäure angesäuertes Wasser
→ 5 ml Essigsäure + 1 l dH₂O

	Chemikalien	Dauer	Funktion
1.	Xylol	10 min.	Entparaffinierung/Hydratisierung
2.	Xylol	10 min.	~
3.	100% EtOH	5 min.	~
4.	100% EtOH	5 min.	~
5.	95% EtOH	5 min.	~
6.	70% EtOH	5 min.	~
7.	50% EtOH	5min	~
8.	Aqua dest	30 sec./10 Dips	Spülen
9.	Sirius Rot (A)	1 h	Färbung
10.	mit Essigsäure angesäuertes Wasser (B)	1x kurz spülen, abgießen,	Spülen
11.	mit Essigsäure angesäuertes Wasser (B)	5 min.	Spülen
12.	100% EtOH	30 sec./10 Dips	Dehydratisierung
13.	100% EtOH	30 sec./10 Dips	Dehydratisierung
14.	Xylol	2-3 min.	Dehydratisierung

Tab. 8: Protokoll der Sirius Rot-Färbung.

Zur Langzeitlagerung wird das Präparat nach der Färbung mit harzhaltigem Medium (Roti Histokit) und geeigneten Deckgläschen (VWR) luftdicht verschlossen.

Ki-67-Immunhistochemie:

Ki-67 bezeichnet einen Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis des pKi-67-Antigens, welches ausschließlich in sich „aktiv“ teilenden Zellen während der Zellzyklusphasen G1, S, G2 oder Mitose, vorkommt. Während das Antigen in der Interphase ausschließlich im Inneren des Zellkerns (Nukleus) lokalisiert ist, wird zur Zeit der Mitose ein Großteil des Proteins auf die Oberfläche der Chromosomen verlagert. Die Tatsache, dass das Ki-67-Protein in aktiven Zellen vorhanden ist, jedoch in sich ruhenden Zellen fehlt, macht es zu einem guten Proliferationsmarker, welcher die Bestimmung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation ermöglicht [174].

Im Anschluss an die Deparaffinisierung und Rehydratisierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe wird zunächst die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit dreiprozentiger H_2O_2 -Lösung blockiert, welche zu unspezifischen Reaktionen führen kann. Des Weiteren werden durch Inkubation mit einer Protein-Blockierungs-Lösung (Reagenz I des HRP-Polymer-Kits) Hintergrundfärbungen minimiert, welche durch unspezifische Bindung des Erstantikörpers (anti-Ki-67) oder Zweitantikörpers im verwendeten HRP-Polymer-Kit verursacht werden.

Nach Inkubation mit dem Erstantikörper, der Postblockierungslösung und dem HRP-Polymer, nach denen jeweils ein Waschschrift erfolgt, wird schließlich die enzymatische Reaktion der Peroxidase durch Hinzufügen eines chromogenen Substrates (hier: Diaminobenzidin (DAB)-Lösung) gestartet, wobei durch Oxidation des Diaminobenzidins ein dunkelbraunes Präzipitat gebildet wird. Dieses ist in organischen und wässrigen Lösungsmitteln unlöslich, kann im Durchlichtmikroskop detektiert werden und bleicht nicht aus.

Der Primärantikörper Anti-Ki-67 SP6 (Thermo Scientific) wurde 1:100 in Antikörper-Verdünnungspuffer (Antibody Diluent, Cat. No. ZUC025-500, Firma Zytomed Systems) verdünnt.

Das ZytoChem-Plus HRP-Polymer-Kit (Zytomed Systems):

Reagenz 1: Blockierungs-Lösung (Unspezifische Blockade)

Reagenz 2: Postblockierungs-Lösung (Verstärkungsreagenz)

Reagenz 3: HRP-Polymer (Maus/Kaninchen)

Letzteres besteht aus zahlreichen sekundären Antikörpermolekülen, welche kovalent mit mehreren Molekülen der Meerrettich-Peroxidase (*horse reddish peroxidase*, HRP) verbunden sind.

Ansatz Citrat-Puffer (1x), pH 6,0:

1:10 Verdünnung des Citrat-Puffers, 10x (Firma Zytomed, Cat. No. ZUC028-500) in dH_2O

Ansatz Tris-Puffer (1x):

1:20 Verdünnung Tris-Puffers, 20x (Firma Zytomed, Cat. No. ZUC020-2500) in dH₂O

Ansatz DAB-Lösung (DAB Substrat Kit, Firma Zytomed, Cat. No. DAB530):

1:20 Verdünnung des DAB Chromogens (flüssiges DAB Konzentrat) in DAB-Substratpuffer

Ansatz für 3 %ige H₂O₂-Lösung:

1:10 Verdünnung der 30% igen H₂O₂-Lösung (Firma Merck) in dH₂O
 → 1 ml 30 % H₂O₂ + 9 ml dH₂O

Ansatz für Mayer's Häkalaun-Lösung:

1:3 Verdünnung der Mayer's Häkalaun-Lösung (Firma Merck) in dH₂O

	Chemikalien	Dauer	Funktion
1.	Xylol	15 min	Entparaffinierung/Hydratisierung
2.	Xylol	15 min.	~
3.	100% EtOH	5 min.	~
4.	100% EtOH	5 min	~
5.	90% EtOH	5 min	~
6.	70% EtOH	5 min	~
7.	50% EtOH	5 min	~
8.	20% EtOH	5 min	
9.	E-Wasser	5 min	Waschen
10.	Citrat-Puffer (1x) pH 6	30 min	Permeabilisierung bei 97°C im Wasserbad
11.		20 min	Abkühlen
12.	E-Wasser	5 min	Waschen
13.	3% H ₂ O ₂ -Lösung	5 min	Peroxaasehemmung
14.	Tris-Puffer (1x)	5 min	Waschen
15.	Reagent 1 (HRP-Polymer-Kit)	5min, RT.	Unspezifische Blockade
16.	Tris-Puffer (1x)	5 min	Waschen
17.	Anti-Ki-67 (1:100)	60 min, RT	Primär-Antikörper
18.	Tris-Puffer	5 min	Waschen
19.	Reagent 2 (HRP-Polymer Kit)	20 min, RT	Postblock
20.	Tris-Puffer (1x)	5 min	Waschen
21.	Reagent 3 (HRP-Polymer Kit)	30 min, RT	Markierung mit HRP-Polymer
22.	DAB-Lösung (1x)	15 min, RT	Visualisierung
23.	Leitungswasser	5 min	Waschen
24.	Häkalaun	2 min	Gegenfärbung
25.	Leitungswasser		Bläuen

Tab. 9: Protokoll der Ki-67-Immunhistochemie.

Der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Nuklei in der Leber von Versuchstieren (nach partieller Hepatektomie) wurde durch Auszählung von 20 Gesichtsfeldern je Paraffinschnitt bei 400-facher Vergrößerung bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert Ki-67-positiver Nuklei und Standardabweichungen des Mittelwertes dargestellt.

2.2.7 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der Versuchstiere hinsichtlich des humanen *UGT1A*-Transgens wurde jeweils 0,5 mm Schwanzspitze mittels DirectPCR Lysis Reagenz (mouse tail; Viagen) und Proteinase K im Thermomixer aufbereitet (650 rpm; ü.N. bei 55°C ,45 min bei 85°C).

Ansatz und Durchführung:

0,5 cm Schwanzspitze

2,5 µl Proteinase K (Qiagen)

200 µl DirectPCR Lysis Reagenz

Nach Zentrifugation des Ansatzes (5min, 13000rpm) wurden 2 µl der extrahierten DNA unter Verwendung einer BiothermTM Taq DNA Polymerase (Tab.3) für die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt.

UGT1A3-PCR-Ansatz (Gesamt Volumen 25 µl):

2,0	µl	DNA	ca. 10-100 ng
2,5	µl	Biotherm Reaction Buffer	10x
1,25	µl	Primer Allgen	10 µM
1,25	µl	Primer GT1A3	10 µM
0,50	µl	dNTP	10 mM
0,25	µl	Biotherm Taq Polymerase	1 U
1,0	µl	MgCl ₂	50 mM
16,25	µl	H ₂ O	

Standard-PCR-Programm		
Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	5 min	1
94 °C	40 sec	30
56 °C	40 sec	
72 °C	1 min pro 1 kb zu amplifizierender Sequenz	
72 °C	7 min	

Tab. 10: Parameter des *UGT1A3*-PCR-Programms.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Identifizierung, Auftrennung, Reinheitsüberprüfung und Längenbestimmung von DNA-Molekülen (analytische Gele) erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, wobei in dieser Arbeit 1%ige Agarosegele verwendet wurden. Diese wurden jeweils mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, welches durch Interkalation mit der DNA sein Absorptionsspektrum verändert. Aus der anschließenden UV-Licht-Bestrahlung (280nm) der DNA-Moleküle resultiert die Abgabe von Fluoreszenzlicht durch Ethidiumbromid wodurch deren Visualisierung ermöglicht wird.

Die zunächst mit 10x-Ladepuffer gemischte DNA-Lösung wurde in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer bei einer Spannung von 120 Volt aufgetrennt.

Mit Hilfe einer UV-Dokumentationsanlage und eines computergesteuerten Programms (Software Gel Cam) wurden die analytischen Gele dokumentiert und ausgewertet.

2.2.9 RNA-Isolierung

Die RNA wurde mittels TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) isoliert. Dazu wurden 50-100 mg des gewünschten Organs mit 1ml TRIzol[®] Reagent versetzt und mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl Chloroform dazugegeben und 15 sek. gevortext. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation für 15 min (12000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Nachdem die RNA bei

Raumtemperatur für 10 min gefällt wurde, erfolgten ein weiterer Zentrifugationsschritt (12000 x g, 4°C) und Waschen mit 1 ml 70%igem Ethanol. Das RNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 30-100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

2.2.10 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Umschreibung von RNA zu cDNA erfolgte mit Hilfe des Super Script™ III First – Strand Synthesis System für RT-PCR von Invitrogen (siehe 2.1.13). Im ersten Schritt wurde hierfür zunächst ein DNA-Verdau für 15 min bei Raumtemperatur angesetzt.

Ansatz DNase I-Verdau und Durchführung (Gesamt-Volumen 10 µl):

x	µl	RNA	5 µg
1,0	µl	DNaseI	1 U/µl
1,0	µl	DNase I Puffer	10 x
x	µl	DEPC-behandeltes Wasser	

Zur Inaktivierung der DNase I wurde danach zu jedem Ansatz jeweils 1µl EDTA pipettiert und dieser 10 min lang bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde je Ansatz wieder 1 µl entnommen, um in der darauffolgenden TaqMan-PCR die Abwesenheit von DNA im Ansatz nach DNase I-Verdau zu überprüfen (NTCs).

Für den RT-PCR-Ansatz wurden nach DNase I-Verdau je 1 µl Oligo-dTs bzw. dNTPs hinzugegeben und dann für 5 min bei 65°C inkubiert.

RT-PCR-Ansatz und Durchführung:

x	µl	RNA (nach DNase-Verdau)	5 µg
1,0	µl	Oligo (dT)	50 µM
1,0	µl	dNTP-Mix	10 mM
x	µl	DEPC-behandeltes Wasser	

Schließlich wurde der Ansatz für 1 min auf Eis gesetzt und mit 8 µl des folgenden Mastermixes versetzt:

2,0	µl	RT Puffer	10 x
4,0	µl	MgCl ₂	25 mM
2,0	µl	DTT	0,1 M
1,0	µl	RNAse Out TM	40 U/µl
1,0	µl	Superscript III RT	200 U/µl

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 50 °C für 60 min. Im letzten Schritt wurden die Enzyme durch Erhitzung auf 85 °C für 5 min inaktiviert. Für eine darauf folgende TaqMan PCR wurden jeweils 1 µl der gewonnenen cDNA verwendet.

2.2.11 TaqMan PCR

Bei der Taqman-PCR handelt es sich um eine Modifikation des erstmals 1991 von HOLLAND et al. beschriebenen 5'-Nuclease PCR Assays, bei der die 5'-Exonuklease-Aktivität der verwendeten DNA-Polymerase ausgenutzt wird [175].

Allerdings werden im Gegensatz zum ursprünglichen Assay während dieser real-time – PCR fluorogene Sonden eingesetzt. An diesen ca. 15-30bp langen Oligonukleotiden ist das 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert, während an das 3'-Ende ein Quencher (Rhodamin-Derivat oder nicht-fluoreszenter Quencher) gebunden ist [176]. Letzterer unterdrückt dabei die Fluoreszenz des an die sequenzspezifische Sonde gebundenen Reporterfluorochroms am 5'-Ende.

Durch Bindung der Sonde innerhalb des zu amplifizierenden Genabschnittes (zwischen Forward-und Reverse-Primer) während der PCR kann die verwendete HotGoldStar-DNA-Polymerase an das freie 3'-Ende des Forward-Primers binden und die Sequenz bis zum 5'-Ende der Sonde amplifizieren (Abb. 18). Dabei sollte die Länge der zu amplifizierenden Sequenz idealerweise 80bp nicht überschreiten.

Infolge der Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase wird die zuvor an den DNA-Einzelstrang gebundene Sonde hydrolysiert (Abbau vom 5'-Ende); es kommt zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen Reporter und Quencher und einer Aufhebung der Unterdrückung der Reporterfluoreszenz. Das insgesamt resultierende Fluoreszenzsignal wird somit messbar, wobei jeder neu gebildete DNA-Strang jeweils ein Molekül eines Fluoreszenzfarbstoffes ergibt. Aufgrund der TaqMan-Sonden lässt sich die Menge neu synthetisierter DNA zu jedem Zeitpunkt der PCR detektieren.

Um den cDNA-Gehalt der zu analysierenden DNA überprüfen zu können, wurde diese in einem Parallelansatz mit β -Actin als Referenzgen verwendet.

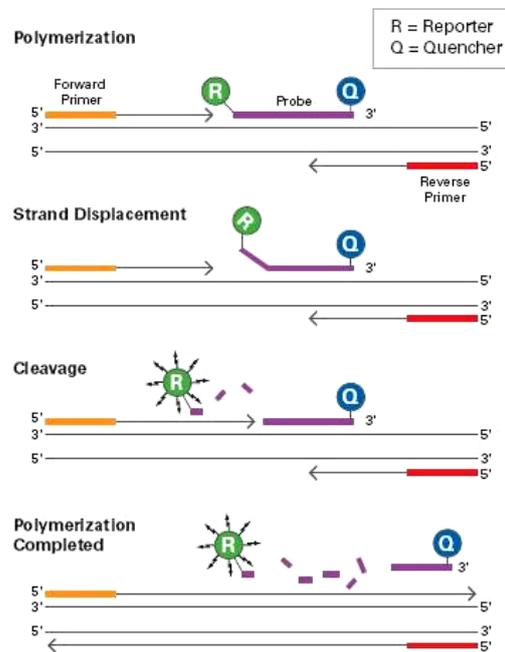


Abb. 18: TaqMan® Exonuclease Assay. Aus *White Paper TaqMan® Gene Expression Assays 2006* [176].

Alle in dieser Arbeit verwendeten Sonden- und Primersequenzen sind in Tabelle 2 enthalten. Als Fluoreszenzfarbstoffe am 5'-Ende wurden sowohl 6-Carboxyfluorescein (FAM, blau) als auch VIC (grün) benutzt. Der Quencher am 3'-Ende der Sonden war dagegen mit 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin (TAMRA, gelb) bzw. dem Minor Groove Binder (MGB, nicht-fluoreszent) markiert.

TaqMan PCR-Ansatz für *UGT1A*-Genexpressionsanalyse:

12,5 μ l	Master Mix (Eurogentec):	
0,25 μ l	Sonde	100 nM
1,5 μ l	Primer F	600 nM
1,5 μ l	Primer R	600 nM
1,0 μ l	cDNA (div. verd.)	
8,25 μ l	dd H ₂ O auf 25 μ l	

TaqMan PCR-Ansatz für β -Actin-Genexpressionsanalyse:

12,5 μ l	Master Mix (Eurogentec):	
0,25 μ l	Sonde (murines Actin)	100 nM
0,75 μ l	Primer F	300 nM
0,75 μ l	Primer R	300 nM
1,0 μ l	cDNA (div. verd.)	
9,75 μ l	dd H ₂ O auf 25 μ l	

TaqMan PCR-Ansatz für Genexpressionsanalyse(Cytokine, Transkriptionsfaktoren):

12,5 μ l	Master Mix (Eurogentec):	
1,25 μ l	Sonde+Primer-Mix*	100 nM
1,0 μ l	cDNA (div. verd.)	
10,25 μ l	dd H ₂ O auf 25 μ l	

*Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2, FXR, Cytokine Il-6, TNF- α

Für jeden TaqMan-PCR-Ansatz wurde zunächst ein Gemisch aus H₂O, Primern, Master Mix (qPCR MasterMix Plus) und Sonde hergestellt und auf die Wells einer 96-Well PCR Platte verteilt. Anschließend wurden jeweils 1 μ l der zu untersuchenden cDNA-Probe hinzupipettiert (3-fach-Ansatz)

Nach Versiegelung der 96-Well-Platte mit einer Plastikfolie erfolgte die Analyse mit Hilfe des ABI Prism® 7000 Sequence Detection Systems und der Software Sequence Detection (Version 1.2.3.) von Applied Biosystems.

TaqMan PCR		
Temperatur	Zeit	Zyklen
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	} 40
60 °C	1 min	

Tab. 11: Reaktionsbedingungen der TaqMan PCR.

Die Normalisierung und Ermittlung der relativen Expression der verschiedenen *UGT1A*-Gene bzw. der Cytokine und Transkriptionsfaktoren erfolgte mit Hilfe der Microsoft Excel basierten Software Qgene.

2.2.12 Biostatistik

Für den Vergleich verschiedener Gruppen wurden statistische Analysen mit Hilfe des Student's t-Test in Microsoft Office Excel 2003 durchgeführt. Sofern der p-Wert kleiner als 0,05 war, wurden Unterschiede als signifikant betrachtet. Je nach Versuch dienten als Vergleichsgruppe verschiedene Werte, daher werden sie an entsprechender Stelle in den Abbildungsbeschriftungen deklariert.

3. Ergebnisse

3.1 Behandlung humanisierter *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse mit dem FXR-Agonisten GW4064

In früheren Studien (*Strassburg et al., 2010*) konnte *in vitro* bereits eine GW4064-induzierte Heraufregulation des humanen *UGT1A3*-Gens gezeigt werden (Daten hier nicht gezeigt). In dieser Arbeit sollte daher die Induzierbarkeit der *UGT1A*-mRNA-Expression in *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen durch GW4064 untersucht werden.

Vier männlichen *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäusen wurde vier Tage lang einmal täglich der FXR-Agonist GW4064 (30 mg/kg/Tag, Vehikel 10 % DMSO / 90 % Maiskeimöl [Corn Oil]) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Als Kontrolle wurden jeweils zwei männliche *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse vier Tage lang mit 10 % DMSO / 90 % Corn Oil i.p. injiziert (siehe 2.2.1).

3.1.1 Serumtransaminaseaktivitäten nach GW4064-Behandlung

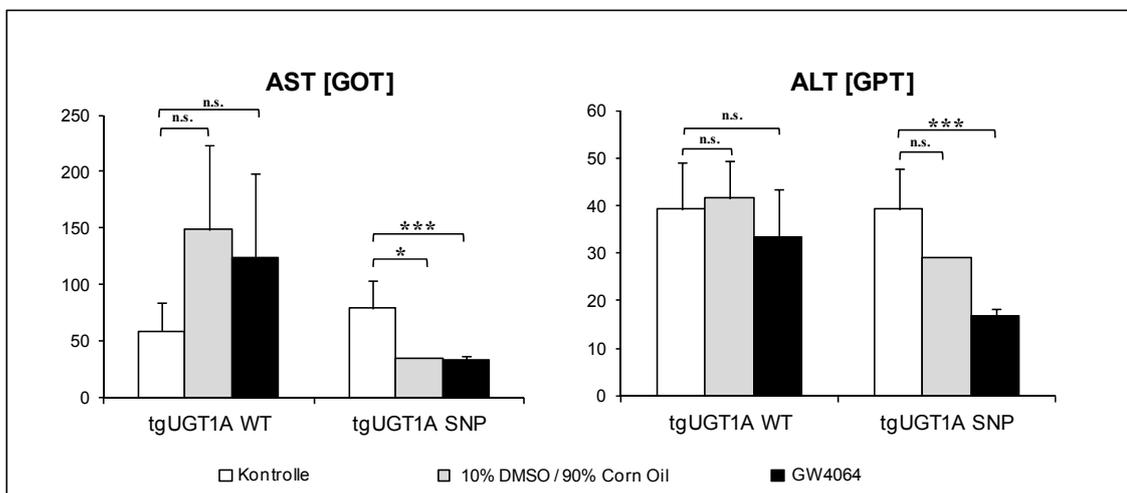


Abb. 19: Serumtransaminaseaktivitäten nach GW4064-Behandlung in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

Die Behandlung *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse mit GW4064 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Serumtransaminaseaktivitäten im Vergleich zur Gruppe

der Versuchstiere, denen intraperitoneal 10% DMSO/ 90% Corn Oil verabreicht wurde (Abb. 19). Allerdings zeigte sich bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen, die mit GW4064 behandelt wurden eine signifikante Abnahme des AST- und ALT-Levels im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (AST: $p < 0,01$, ALT: $p < 0,001$).

3.1.2 Histologie der Leber nach GW4064-Behandlung

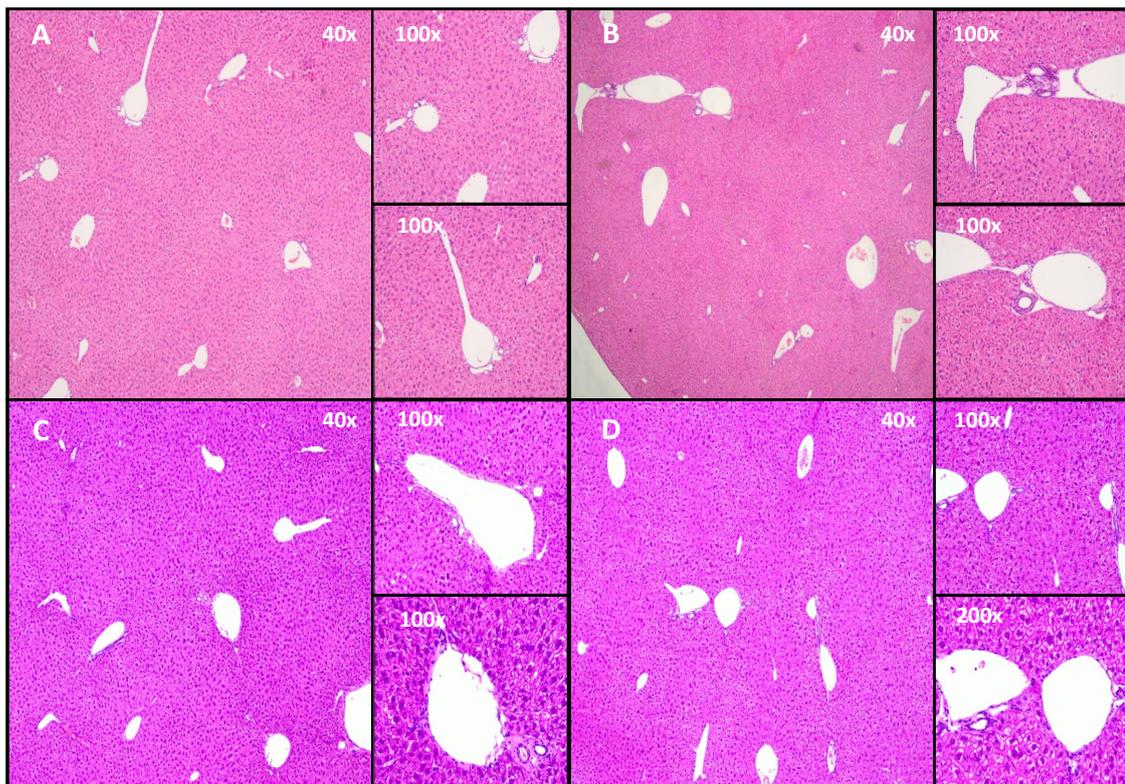


Abb. 20: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach GW4064-Behandlung und Kontrollen (DMSO/ Corn Oil). (A) *tgUGT1A-WT*: 10%DMSO / 90% Corn Oil (Kontrolle), (B) *tgUGT1A-WT*: GW4064, (C) *tgUGT1A-SNP*: 10%DMSO / 90% Corn Oil (Kontrolle), (D) *tgUGT1A-SNP*: GW4064.

Nach Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse mit GW4064 waren in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Leber im Vergleich zu Kontrollen keine histopathologischen Veränderungen zu erkennen (Abb. 20).

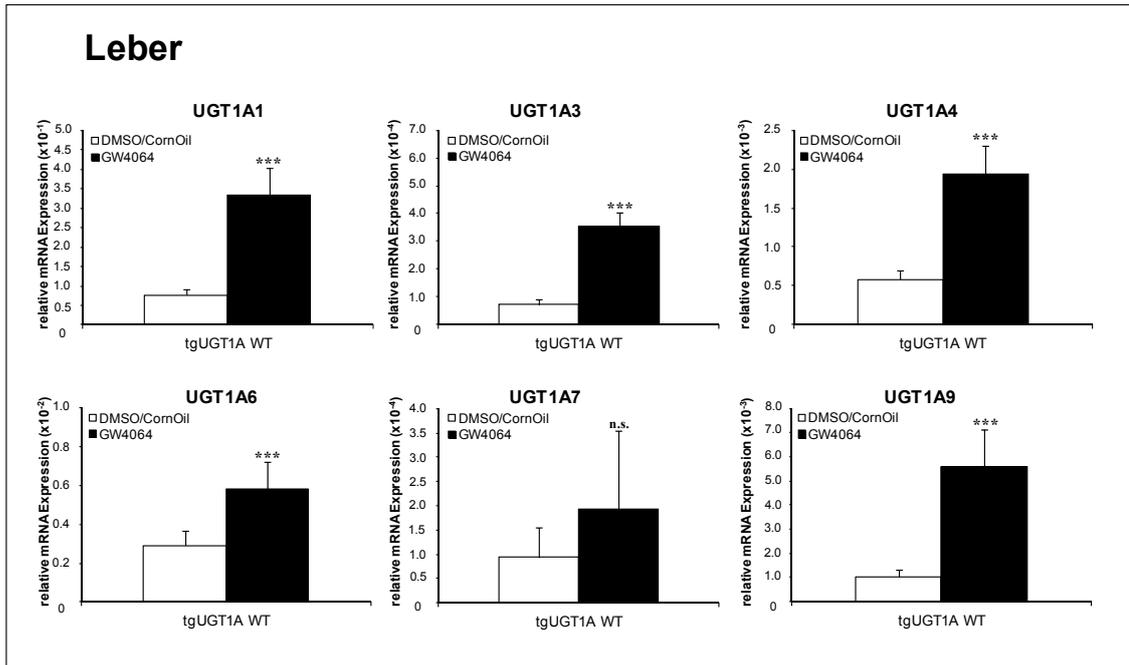
3.1.3 Hepatische *UGT1A*-Expression nach GW4064-Behandlung

Abb. 21: GW4064-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen. WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, ***: $p > 0,001$.

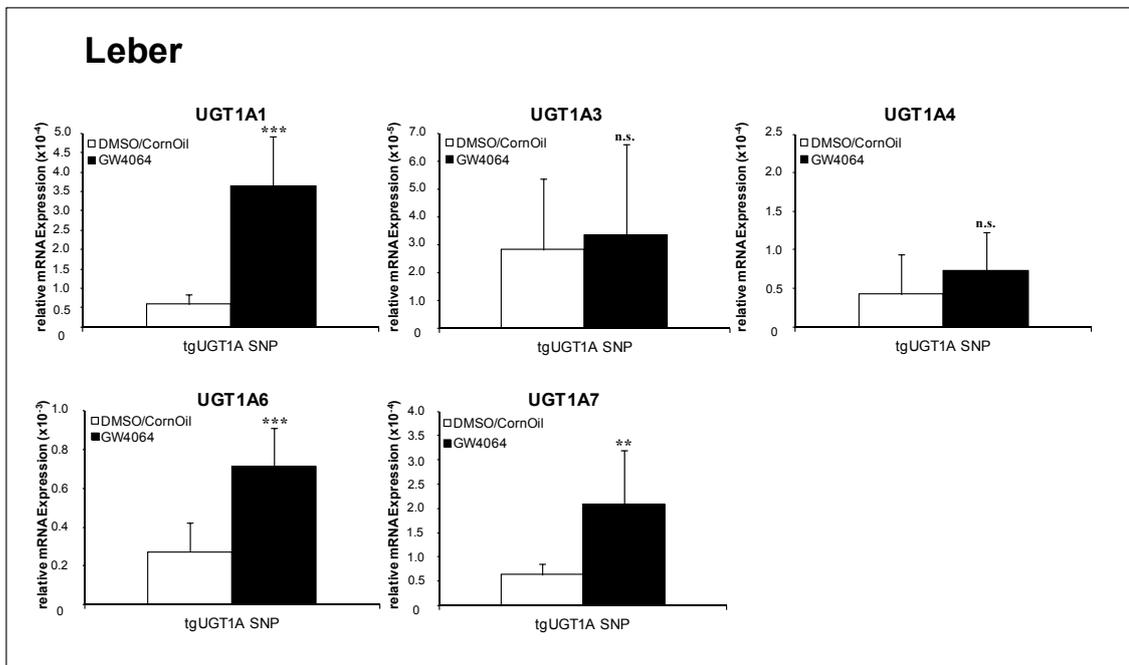


Abb. 22: GW4064-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion in der Leber von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, **: $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

Nach GW4064-Behandlung zeigten *tgUGT1A-WT*-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe (10% DMSO / 90% Corn Oil) eine deutliche Induktion aller *UGT1A*-Gene (2,0- bis 4,9-fach) in der Leber (Abb. 21). Die höchste Heraufregulation wurde dabei für *UGT1A1* (4,4-fach) und *UGT1A3* (4,9-fach) beobachtet.

Auch in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen wurden hepatische UGTs nach GW4064-Applikation, mit Ausnahme von *UGT1A3* und *UGT1A4*, deutlich heraufreguliert (2,6- bis 6,2-fach) (Abb. 22). Allerdings unterscheiden sich die *UGT1A*-mRNA-Expressionslevel zwischen *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen z.T. erheblich (Bsp. *UGT1A1*: WT – 10^1 vs. SNP – 10^4).

3.1.4 Extrahepatische *UGT1A*-Expression nach GW4064-Behandlung

Nach viertägiger GW4064-Behandlung zeigten *tgUGT1A-WT*-Mäuse bis auf *UGT1A1* (1,3-fach) und *UGT1A3* (0,7-fach) im Jejunum keine signifikante Veränderung der extrahepatischen *UGT*-Expression (Abb. 23). In *tgUGT1A-SNP*-Mäusen konnte dagegen, mit Ausnahme von *UGT1A7* (34-fach), eine signifikante Herabregulation der *UGT*-Expression detektiert werden (0,1- bis 0,5-fach). Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen zeigten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse allerdings eine deutlich erhöhte Expression der *UGT1A1*-, *UGT1A3*- und *UGT1A4*-mRNA nach Behandlung mit der Kontrollsubstanz (10% DMSO/ 90% Corn Oil).

Im Kolon *tgUGT1A-WT*-Mäuse wurde eine GW4064-vermittelte signifikante Induktion aller *UGT1A*-Isoformen (2,4- bis 45-fach) gemessen, während bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nur für *UGT1A3* (2,2-fach) und *UGT1A4* (2,3-fach) eine signifikante Heraufregulation extrahepatischer *UGT1A*-Gene detektiert werden konnte. Des Weiteren wurde eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression von *UGT1A1* (0,6-fach) und *UGT1A7* (0,4-fach) festgestellt (Abb. 24).

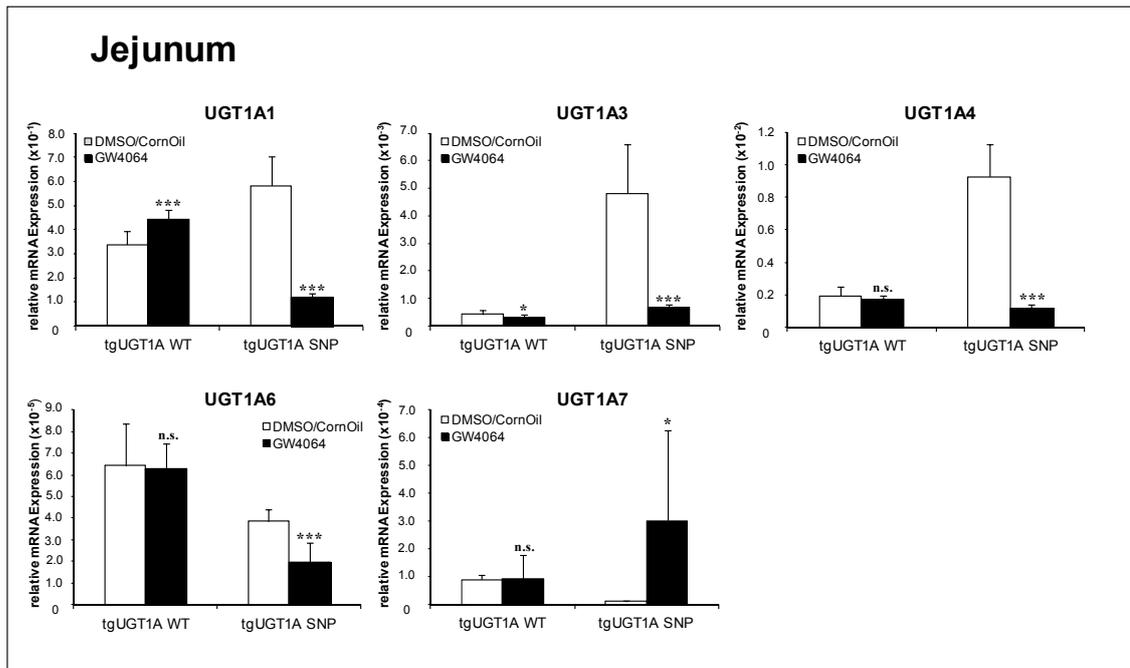


Abb. 23: GW4064-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion im Jejunum von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, *: $p > 0,05$, ***: $p > 0,001$.

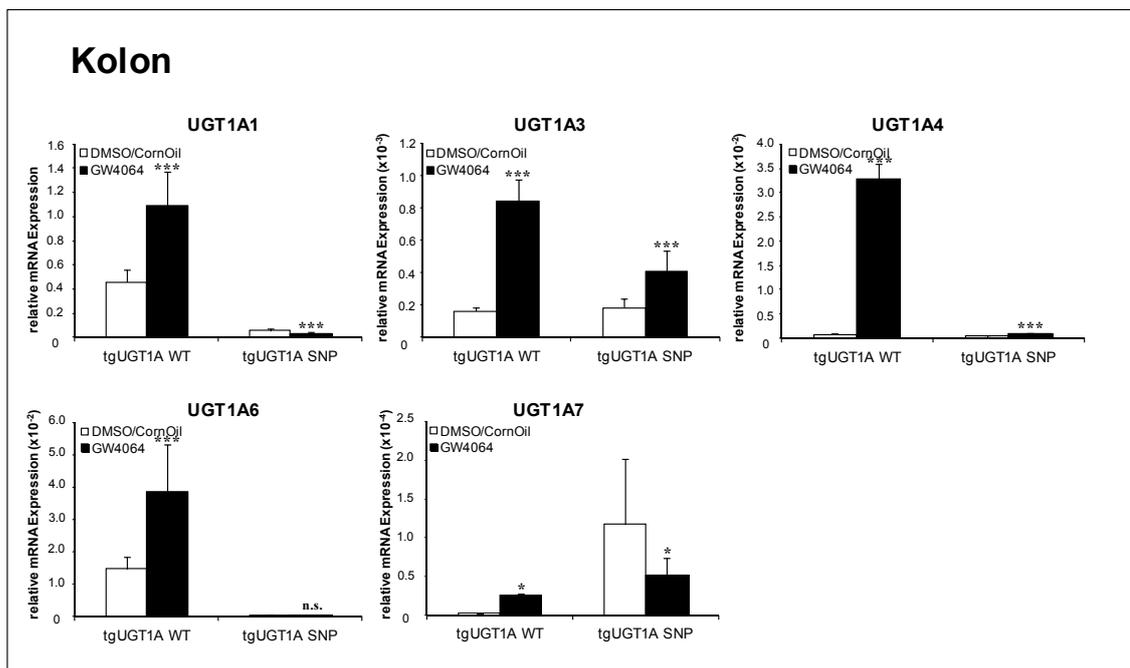


Abb. 24: GW4064-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion im Kolon von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ***: $p > 0,001$.

3.1.5 Hepatische Cytokin-Expression nach GW4064-Behandlung

Nach GW4064-Behandlung wurde sowohl bei *tgUGT1A-WT*- als auch bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen eine Induktion der IL-6- und der TNF- α -mRNA-Expression (IL-6: 1,9-, 2,8-fach; TNF- α : 1,3-, 1,6-fach) beobachtet (Abb. 25).

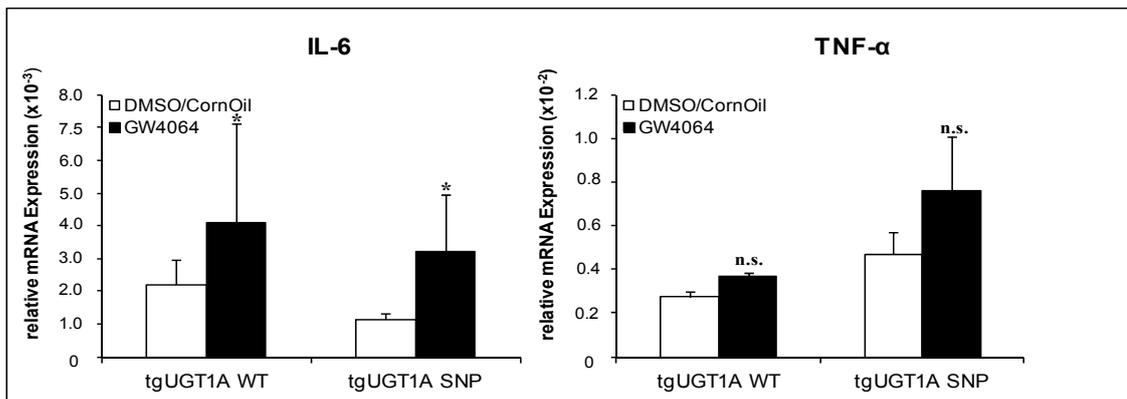


Abb. 25: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α nach GW4064-Behandlung in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, *: $p > 0,05$.

3.1.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren nach GW4064-Behandlung

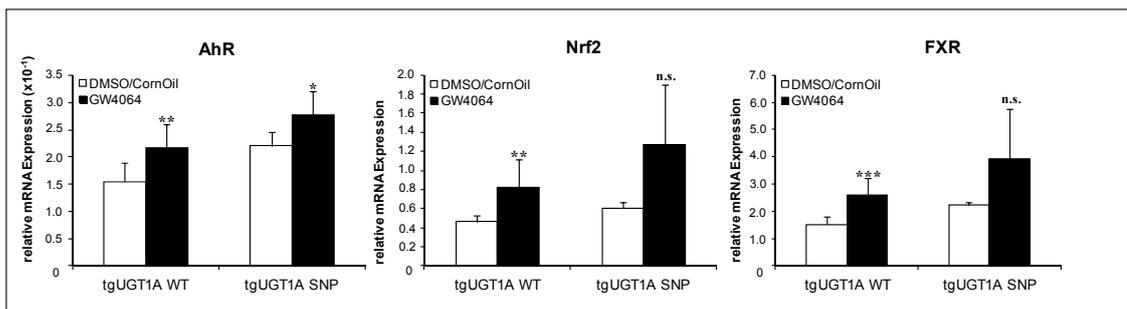


Abb. 26: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR nach GW4064-Behandlung in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

Nach GW4064-Behandlung wurde eine Heraufregulation aller Transkriptionsfaktoren in der Leber von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen detektiert (WT: AhR 1,4-fach, Nrf2 1,8-fach, FXR 1,7-fach; SNP: AhR 1,3-fach, Nrf2 2,1-fach, FXR 1,8-fach) (Abb. 26).

3.2 Gallengangsligatur (BDL) in humanisierten transgenen *UGT1A*-Mäusen

Bei vier (BDL) bzw. zwei (Sham-Kontrolle) männlichen *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäusen wurde unter Isofluran-Anästhesie für 24 Stunden, drei Tage oder fünf Tage eine Ligatur des Gallenganges bzw. eine Laparotomie durchgeführt.

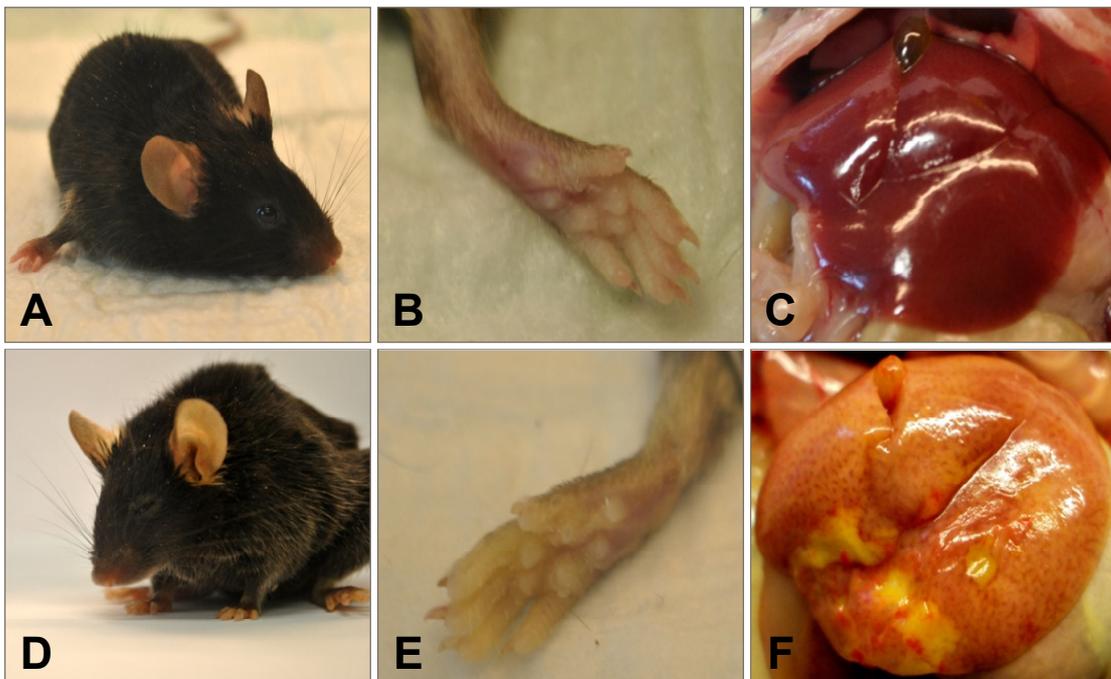


Abb. 27: Makroskopische Erscheinung der Leber nach Sham Laparotomie (C) bzw. BDL (F) sowie Veränderungen der Haut bei Cholestase (D+E) im Vergleich zu Sham-operierten Kontrollen (A+C).

3.2.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel bei Cholestase

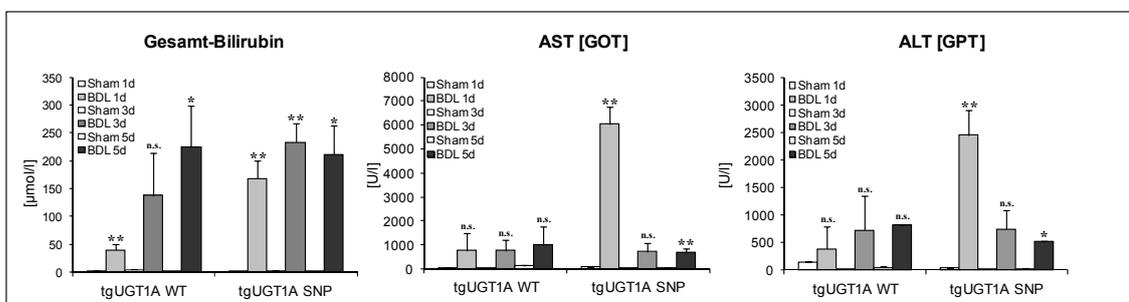


Abb. 28: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$.

Die durch Gallengangsligatur (BDL) hervorgerufene obstruktive Cholestase führte sowohl in *tgUGT1A-WT*-Mäusen (26- bis 117-fach) als auch in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen (116- bis 146-fach) zu einem signifikanten Anstieg des Serum-Bilirubinlevels im Vergleich zu Sham-operierten Versuchstieren (Abb. 28).

Dabei zeigen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach BDL insgesamt ein früheres Ansteigen der Bilirubinspiegel als *tgUGT1A-WT*-Mäuse, bei denen ein zeitlich verzögerter Anstieg des Gesamt-Bilirubins erkennbar ist. Darüber hinaus ergab die Messung der Serum-Transaminaseaktivitäten (ALT/AST) bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen in der frühen postoperativen Phase (nach 24 Stunden) zunächst einen sprunghaften Anstieg um das 50- bzw. 63-fache des Normalwertes, während *tgUGT1A-WT*-Mäuse lediglich eine 3- bis 12-fache Erhöhung der Serumtransaminasen aufwiesen. Im weiteren Verlauf wurde bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen eine 8- bis 16-fach höhere AST- sowie eine 15- bis 49-fach höhere ALT-Aktivität gemessen. *TgUGT1A-SNP*-Mäuse zeigten dagegen eine um das 10- bis 24-fache erhöhte AST- und eine 18-bis 38-fach erhöhte ALT-Aktivität. Fünf Tage nach BDL lagen Transaminaseaktivitäten *tgUGT1A-WT*-Mäuse jedoch durchschnittlich 1,5-fach (n.s.) höher als bei den *tgUGT1A-SNP*-Mäusen.

3.2.2 Histologie der Leber bei Cholestase

Bereits in der frühen postoperativen Phase (24 Stunden nach BDL) lassen sich sowohl in HE- als auch in Sirius-Rot-gefärbten Paraffinschnitten der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen einzelne fibrös erweiterte Portalfelder erkennen (Abb. 29+30 B). Während der manifesten Cholestase (BDL 3-5d) zeigt die Leberhistologie von *tgUGT1A-WT*-Mäusen dann eine deutliche Erweiterung der Gallengänge sowie eine fibröse Expansion der meisten Portalfelder mit fibrösen Septen (Abb 29+30 C+D). Des Weiteren ist eine deutliche Brückenbildung zwischen einzelnen Portalfeldern und der Zentralvene (Portal-Zentral) sowie zwischen benachbarten Portalfeldern (Portal-Portal) zu erkennen (Sirius-Rot-Färbung). Infolge des Rückstaus toxischer Gallensäuren in der Leber kommt es außerdem zu einer Schädigung der Hepatozyten, die hier deutlich anhand nekrotischer Bereiche (BDL 3d, 5d) zu erkennen ist.

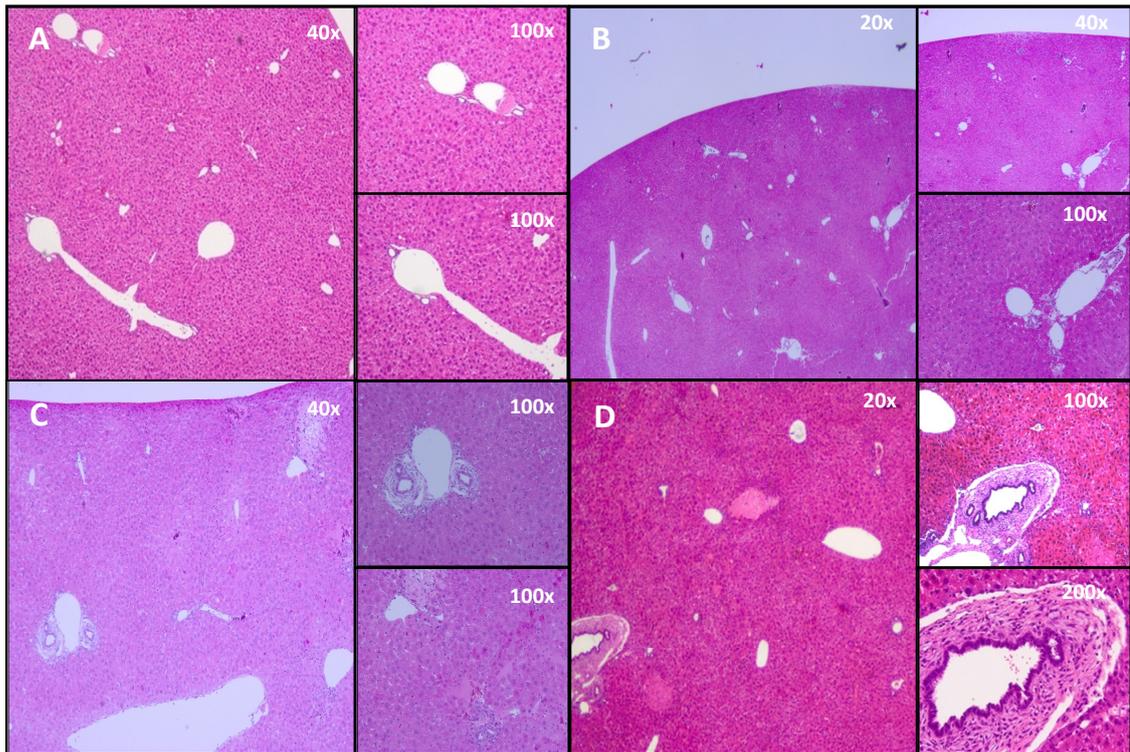


Abb. 29 A-D: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-WT*-Mäuse bei Cholestase. (A) Sham, (B) BDL 1d, (C) BDL 3d, (D) BDL 5d.

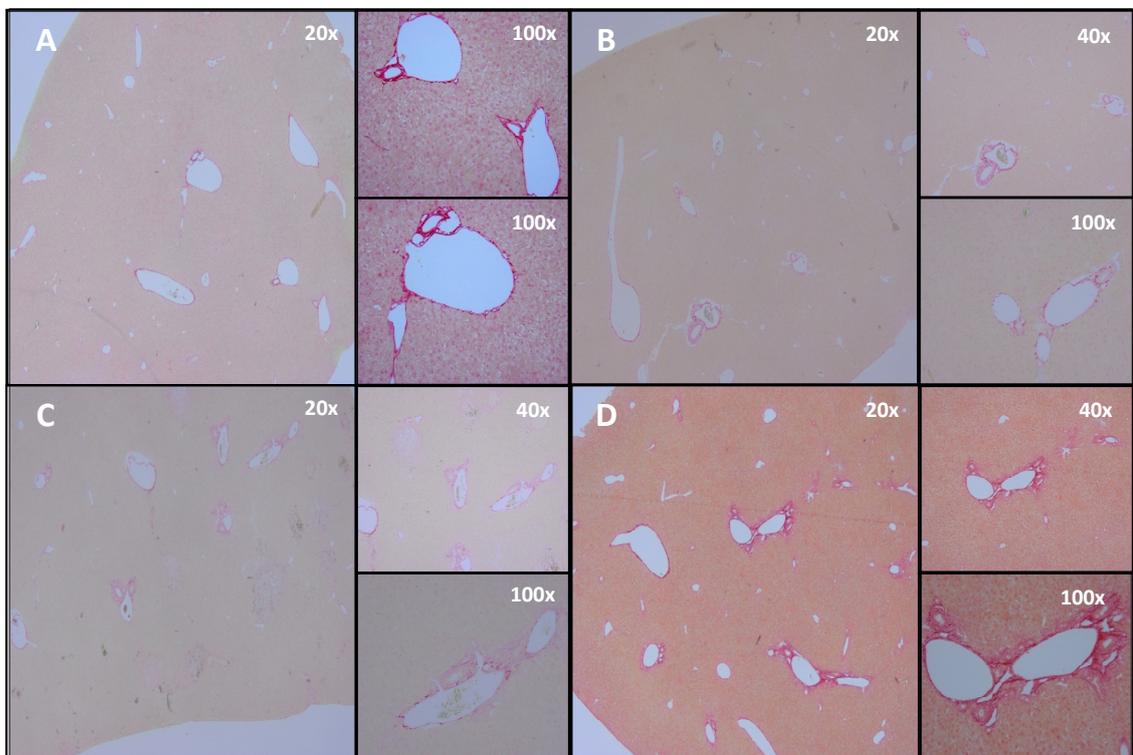


Abb. 30 A-D: Leberhistologie (Sirius-Rot), *tgUGT1A-WT*-Mäuse bei Cholestase. (A) Sham, (B) BDL 1d, (C) BDL 3d, (D) BDL 5d.

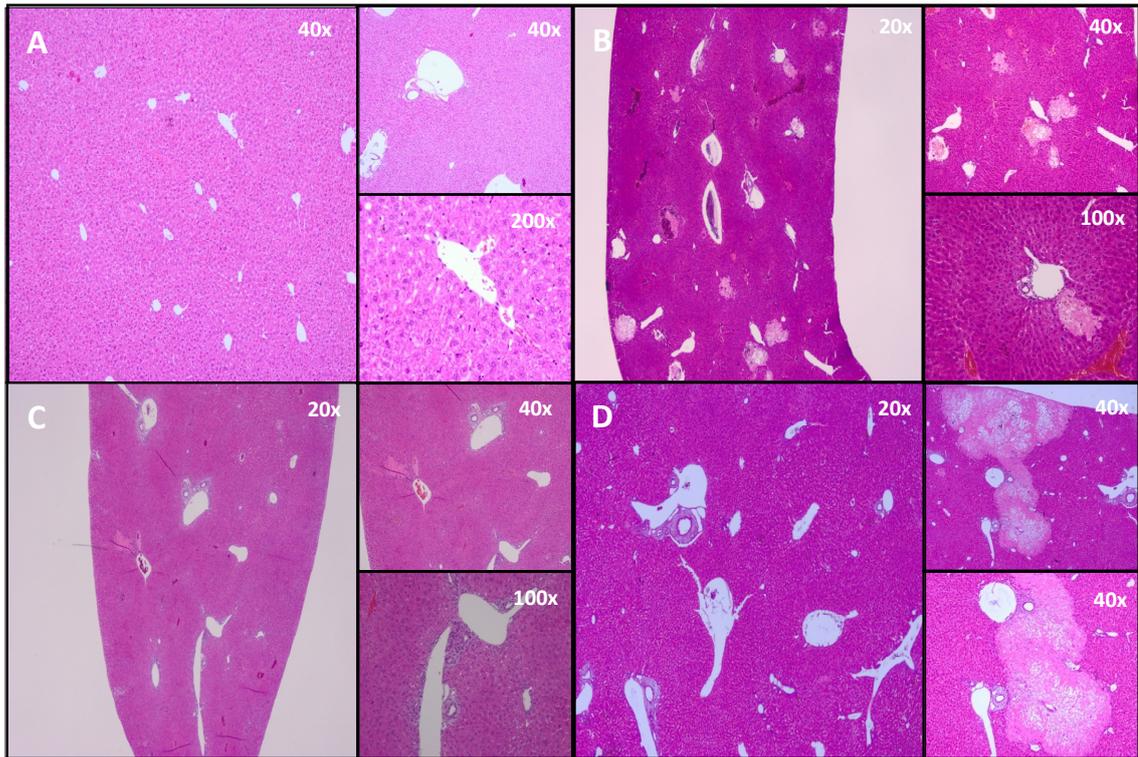


Abb. 31 A-D: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-SNP*-Mäuse bei Cholestase. (A) Sham, (B) BDL 1d, (C) BDL 3d, (D) BDL 5d.

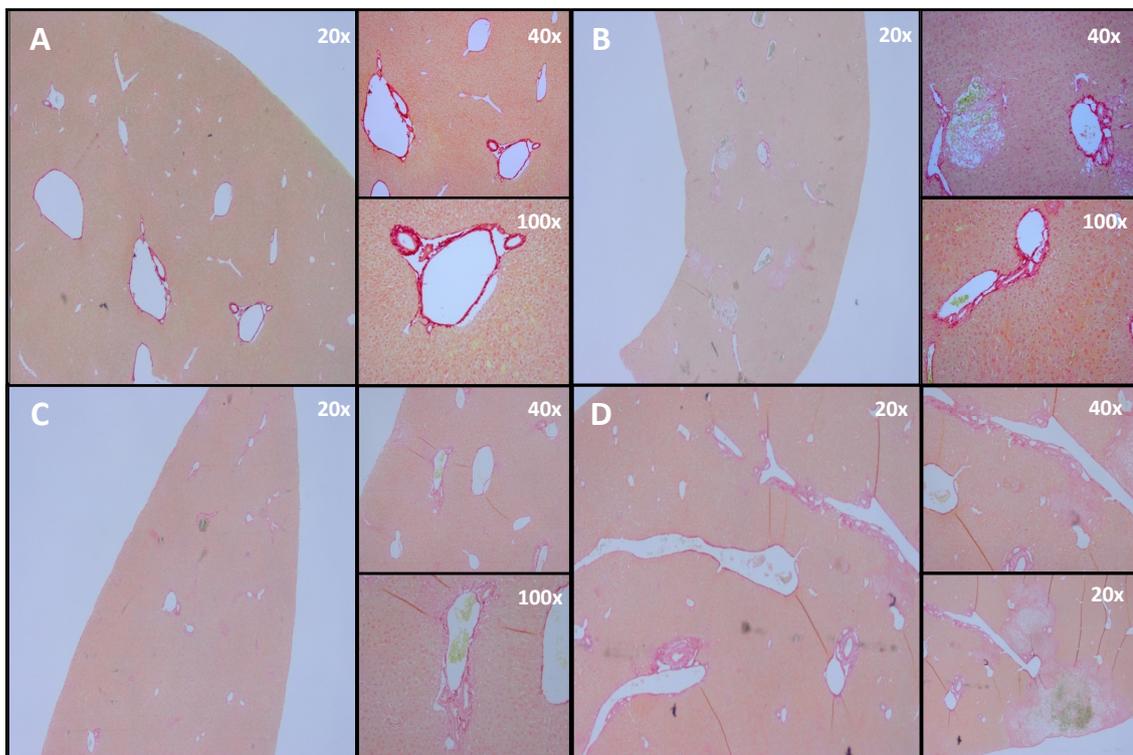


Abb. 32 A-D: Leberhistologie (Sirius-Rot), *tgUGT1A-SNP*-Mäuse bei Cholestase. (A) Sham, (B) BDL 1d, (C) BDL 3d, (D) BDL 5d.

Im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen sind in der Leberhistologie *tgUGT1A-SNP*-Mäuse bereits 24 Stunden nach Gallengangsligatur erhebliche hepatozelluläre Schädigungen (Nekrosen) zu erkennen, welche mit den stark erhöhten Aminotransferaseaktivitäten korrelieren (Abb. 28).

In der manifesten Cholestase (BDL 3-5d) konnte ähnlich wie bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen eine fibröse Erweiterung der meisten Portalfelder, z.T. auch mit Brückenbildung zwischen Portalfeldern beobachtet werden (Abb. 31+32 C+D). Im Gegensatz zur Leberhistologie bei den *tgUGT1A-WT*-Mäusen ist das Ausmaß nekrotischer Bereiche fünf Tage nach BDL bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen jedoch wesentlich höher (Vgl. Abb. 29+30 D und Abb. 31+32 D).

3.2.3 Hepatische *UGT1A*-Expression bei Cholestase

Abb. 33 zeigt die Cholestase-vermittelte Induktion hepatischer *UGT1A*-Isoformen in *tgUGT1A-WT*-Mäusen. Vergleicht man die *UGT1A*-mRNA-Expressionslevel der Sham-Gruppe mit der Gruppe nach Gallengangsligatur (BDL) zu den jeweiligen Zeitpunkten, erkennt man eine deutliche Induktion der *UGT1A*-Expression in der Leber, wobei diese zeitabhängig und isoformspezifisch ist.

Während nach drei bzw. fünf Tagen nach BDL mit Ausnahme von *UGT1A7* alle hepatischen *UGT1A*-Gene induziert werden (2- bis 93-fach; 1,5- bis 4,2-fach), wurde 24 Stunden nach Gallengangsligatur lediglich eine Heraufregulation von *UGT1A1* (10,2-fach), *UGT1A6* (4,9-fach), *UGT1A7* (1,8-fach) sowie *UGT1A9* (3,3-fach) beobachtet. Die Isoformen *UGT1A3* bzw. *UGT1A4* zeigten in der frühen postoperativen Phase im Vergleich zu Sham-operierten Versuchstieren ein 0,4 bis 0,5-fach verringertes mRNA-Expressionslevel.

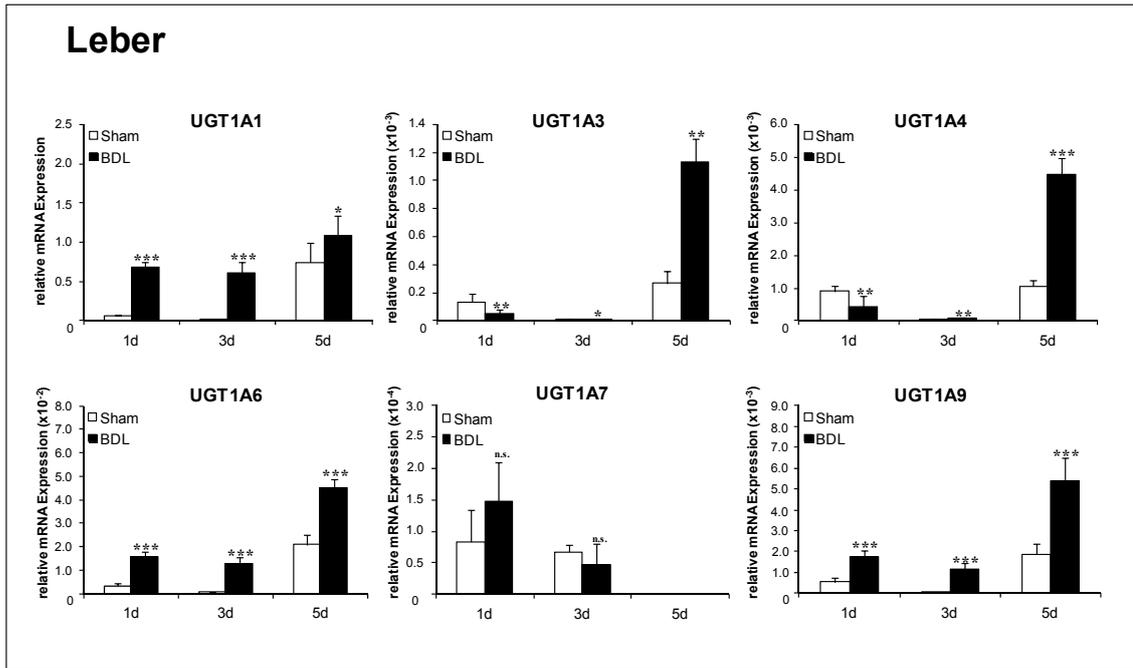


Abb. 33: Cholestase-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen. WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

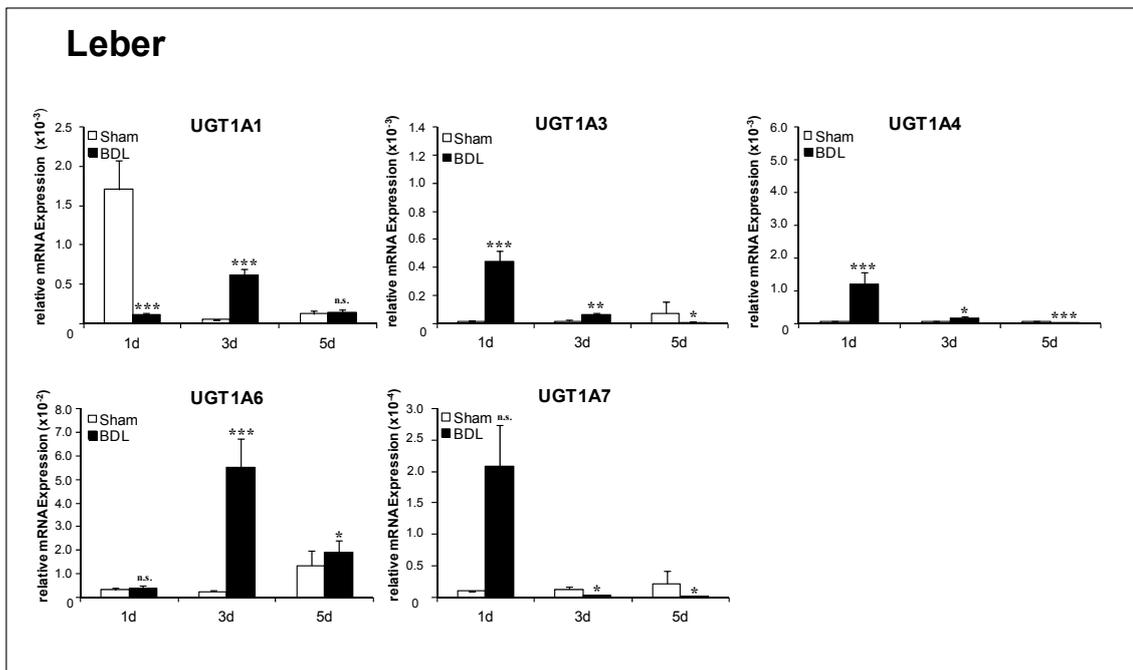


Abb. 34: Cholestase-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion in der Leber von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, *UGT1A9* nicht detektierbar, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

In Abb. 34 ist die Cholestase-vermittelte Induktion hepatischer *UGT1A*-Isoformen in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen dargestellt. Nennenswert ist hierbei erneut der deutliche Unterschied der *UGT1A*-mRNA-Expressionslevel in der Leber zwischen *tgUGT1A*-

WT- und *-SNP*-Mäusen (Bsp. *UGT1A1*: *WT* - 10^0 vs. *SNP* - 10^{-3}). Des Weiteren zeigt sich auch hier eine zeitabhängige und isoformspezifische Induktion der *UGT1A*-mRNA-Expression. Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde 24 Stunden nach Gallengangsligatur ein signifikant verringertes mRNA-Expressionslevel für *UGT1A1* (0,1-fach) sowie eine deutliche Heraufregulation der *UGT1A3*-, *UGT1A4*- und *UGT1A7*-Gene (33-, 24-, 20-fach) gemessen.

Auch 72 Stunden nach BDL konnte eine deutliche Induktion hepatischer *UGT1A*-Gene (3,6- bis 21,5-fach) detektiert werden. Eine Ausnahme bildeten dabei *UGT1A7* und *UGT1A9*. Während in *tgUGT1A-WT*-Mäusen fünf Tage nach Gallengangsligatur eine Heraufregulation aller hepatischen *UGT1A*-Gene beobachtet wurde, konnte in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen lediglich eine Induktion von *UGT1A6* (1,4-fach) gezeigt werden. Die Isoformen *UGT1A3*, *UGT1A4* und *UGT1A7* wiesen ein im Vergleich zu Sham-operierten Versuchstieren 0,1- bis 0,2-fach verringertes Expressionslevel auf. *UGT1A9* konnte in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nicht detektiert werden.

3.2.4 Extrahepatische *UGT1A* –Expression bei Cholestase

In *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde 24 Stunden nach Gallengangsligatur ein signifikant verringertes mRNA-Expressionslevel aller *UGT1A*-Isoformen (0,1- bis 0,7-fach) im Jejunum detektiert (Abb. 35). Nach drei bzw. fünf Tagen konnte dagegen eine Heraufregulation der extrahepatischen *UGT1A*-Genexpression (1,9- bis 4,1-fach), mit Ausnahme von *UGT1A1* (BDL 5d: 1,1-fach), *UGT1A6* (BDL 5d: 0,9-fach) und *UGT1A7* (nicht detektierbar), gemessen werden.

Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen konnte bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen in der frühen postoperativen Phase, mit Ausnahme von *UGT1A7* (0,8-fach) und *UGT1A4* (1,1-fach), eine signifikante Induktion für *UGT1A1* (3,4-fach), *UGT1A3* (1,6-fach) und *UGT1A6* (7,5-fach) gemessen werden. Auch drei Tage nach Gallengangsligatur konnte bis auf *UGT1A7* (0,02-fach) eine deutliche Heraufregulation der *UGT1A*-Expression (1,6- bis 6,8-fach) im Jejunum *tgUGT1A-SNP*-Mäuse detektiert werden. Im Gegensatz dazu steht ein signifikant verringertes mRNA-Expressionslevel (0,3- bis 0,7-fach) während der manifesten Cholestase (BDL 5d). Lediglich für *UGT1A7* konnte eine 1,7-fache Induktion gemessen werden.

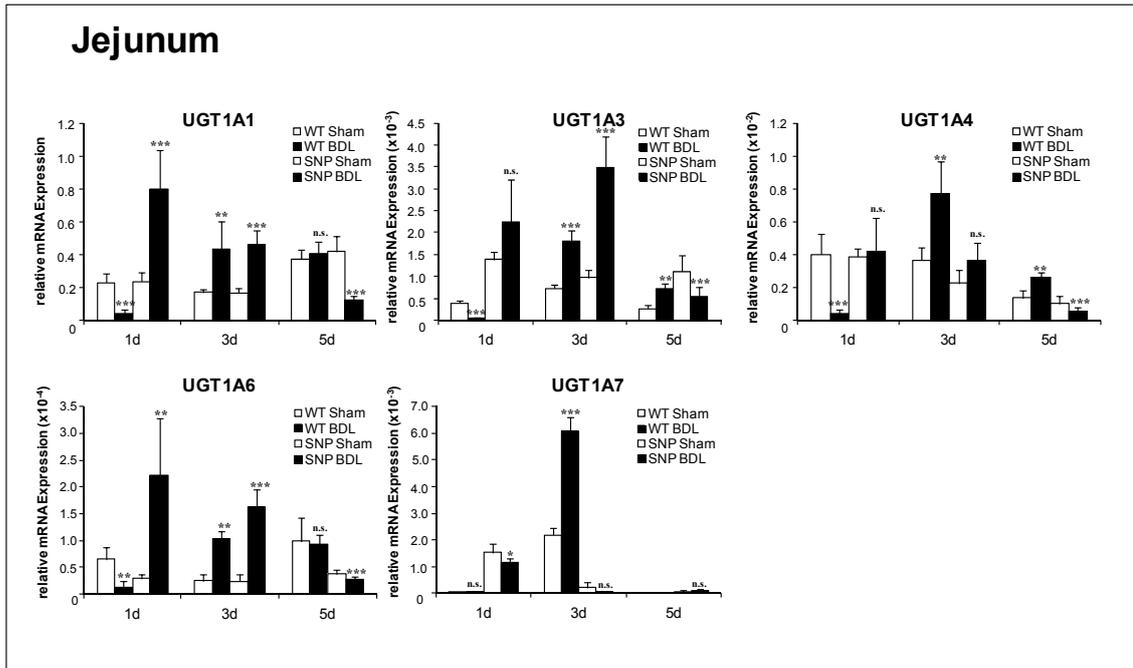


Abb. 35: Cholestase-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion im Jejunum von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

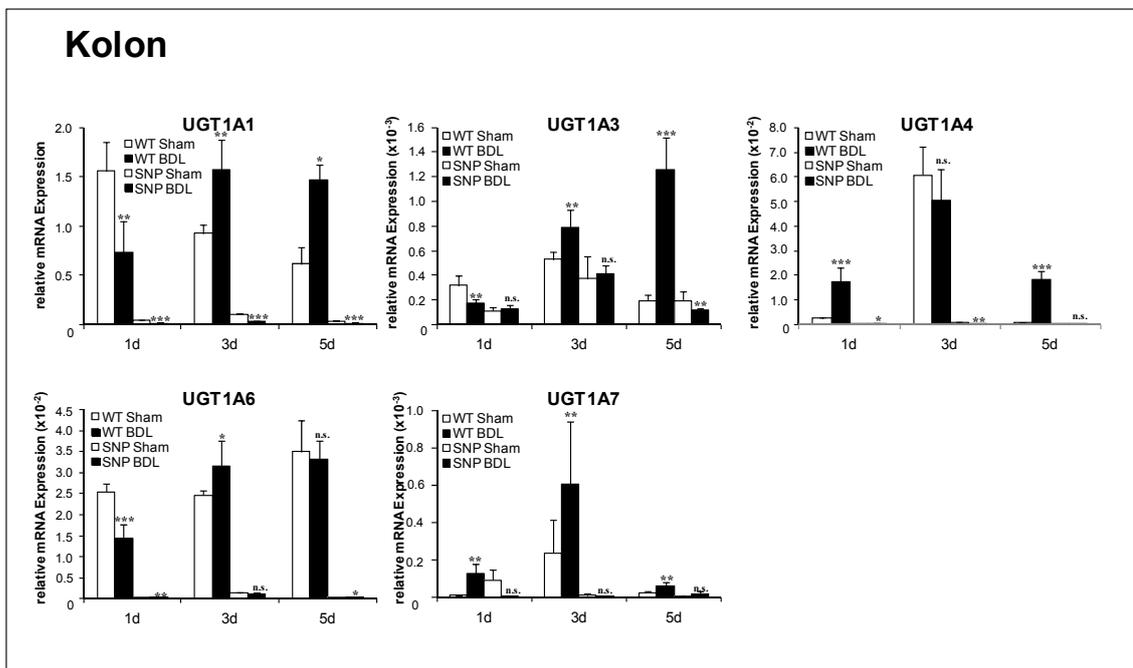


Abb. 36: Cholestase-vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion im Kolon von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

Abb. 36 zeigt die extrahepatische *UGT*-Expression im Kolon cholestatischer *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse. In der frühen postoperativen Phase (24 Stunden) wurde bei

tgUGT1A-WT-Mäusen zunächst ein signifikant verringertes mRNA-Expressionslevel für *UGT1A1*-, *UGT1A3*- und *UGT1A6* (0,5- bis 0,6-fach) gemessen, während *UGT1A4* (7-fach) und *UGT1A7* (8,8-fach) deutlich induziert wurden.

Nach drei bzw. fünf Tagen konnte dagegen, mit Ausnahme von *UGT1A4* (BDL 3d: 0,8-fach) und *UGT1A6* (BDL 5d: 0,9-fach), eine signifikante Heraufregulation aller *UGT1A*-Isoformen (*UGT1A1*: 1,5- bis 1,7-fach, *UGT1A3*: 1,5- bis 6,5-fach, *UGT1A4*: 27,6-fach, *UGT1A6*: 1,3-fach; *UGT1A7*: 2,3- bis 2,5-fach) beobachtet werden.

Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde im Kolon *tgUGT1A-SNP*-Mäuse lediglich eine Heraufregulation für *UGT1A4* (BDL 1d: 1,4-fach) und *UGT1A7* (BDL 5d: 3,1-fach) detektiert. Darüber hinaus wurde eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression für *UGT1A1* (0,25- bis 0,4-fach), *UGT1A3* (BDL 5d: 0,6-fach), *UGT1A4* (BDL 3d: 0,4-fach), *UGT1A6* (0,6- bis 0,8-fach) und *UGT1A7* (BDL 1d: 0,1-fach, BDL 3d: 0,6-fach) gemessen.

3.2.5 Hepatische Cytokin-Expression bei Cholestase

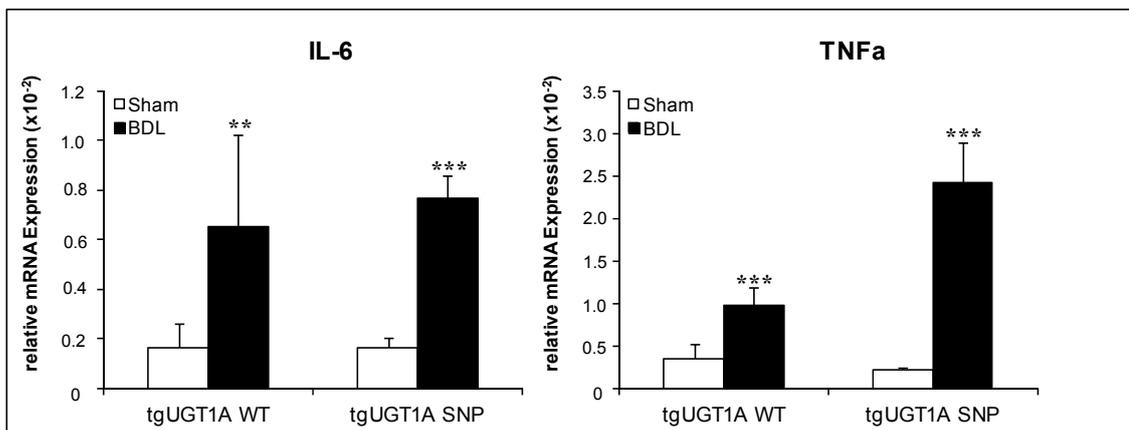


Abb. 37: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen bei Cholestase (BDL 5d). WT: Wildtyp, SNP: Mutante, **: $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

Sowohl für IL-6 (*WT*: 4,0-fach, *SNP*: 4,7-fach) als auch für TNF- α (*WT*: 2,8-fach, *SNP*: 11,2-fach) konnte eine signifikante Heraufregulation der hepatischen mRNA-Expression in *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen während einer manifesten Cholestase

(BDL 5d) beobachtet werden, wobei $\text{TNF-}\alpha$ in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen deutlich stärker induziert wurde (Abb. 37).

3.2.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren bei Cholestase

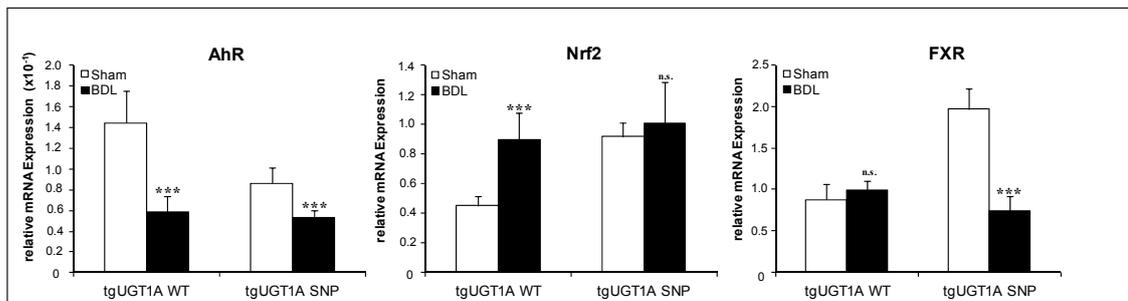


Abb. 38: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen bei Cholestase (BDL 5d). WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, ***: $p > 0,001$.

In Abb. 38 ist die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse während der manifesten Cholestase (BDL 5d) dargestellt. Sowohl in *tgUGT1A-WT*- als auch *-SNP*-Mäusen wurde für den Transkriptionsfaktor AhR eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression gemessen (WT: 0,4-fach, SNP: 0,6-fach). Des Weiteren wurden eine 2-fache Induktion der Nrf2-mRNA-Expression in *tgUGT1A-WT*-Mäusen sowie eine deutliche Herabregulation der FXR-mRNA-Expression in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen detektiert (0,4-fach).

3.3 GW4064-Behandlung humanisierter *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse bei Cholestase

Bei sechs männlichen *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäusen wurde unter Isofluran-Anästhesie eine Ligatur des Gallenganges (BDL) durchgeführt. Innerhalb des postoperativen Beobachtungszeitraums (5 Tage nach BDL) wurden je vier Versuchstiere vier Tage lang einmal täglich mit dem FXR-Agonisten GW4064 (30 mg/kg/Tag, Vehikel 10% DMSO / 90% Corn Oil) i.p. injiziert, beginnend 24 Stunden nach BDL. Zur Kontrolle wurden jeweils zwei *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse vier Tage lang mit 10% DMSO / 90% Corn Oil i.p. injiziert, ebenfalls beginnend 24 Stunden nach BDL.

3.3.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach GW4064-Behandlung bei Cholestase

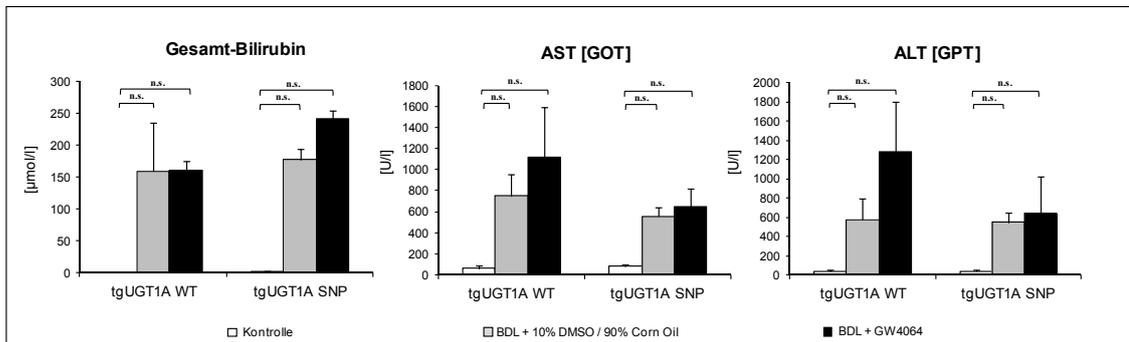


Abb. 39: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach GW4064-Behandlung während der Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant.

Die Behandlung von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen mit GW4064 während der Cholestase führt zu einem 1,4-fachen Anstieg des Bilirubinlevels im Vergleich zur Kontrolle (BDL+DMSO/Corn Oil) bei etwa gleichbleibender Transaminaseaktivität (Abb. 40).

TgUGT1A-WT-Mäuse zeigen dagegen trotz unverändert hohem Bilirubinlevel eine 1,5-fach erhöhte AST-Aktivität sowie einen 2,2-fachen Anstieg der ALT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (BDL+DMSO/Corn Oil) (Abb. 39).

3.3.2 Histologie der Leber nach GW4064-Behandlung bei Cholestase

Die GW4064-Behandlung cholestatischer *tgUGT1A-WT*-Mäuse führte im Vergleich zu Kontrolltieren, denen intraperitoneal vier Tage lang 10% DMSO / 90% Corn Oil nach BDL verabreicht wurde, histologisch zu einem erhöhten Ausmaß nekrotischer Bereiche (Vgl. Abb. 40 A+B und Abb. 41 A+B). Dieses korreliert wiederum mit den deutlich erhöhten Serumtransaminaseaktivitäten nach GW4064-Behandlung bei Cholestase (siehe Abb. 39). Darüber hinaus konnte auch keine Verringerung der mit einer Cholestase einher gehenden Fibrose erreicht werden (Vgl. Abb. 40 A+B und Abb. 41 C+D). Sowohl in der HE- als auch in der Sirius-Rot-Färbung sind deutlich die stark fibrös erweiterten Portalfelder (mit Brückenbildung) zu erkennen.

Bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen führt die GW4064-Behandlung während der manifesten Cholestase histologisch ebenfalls zu keiner Verringerung der Fibrose bzw. der durch toxische Gallensäuren verursachten hepatozellulären Schädigungen (Nekrosen) (Abb. 42 A+B und Abb. 43 A+B). Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen, denen nach BDL intraperitoneal GW4064 verabreicht wurde, zeigen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse jedoch keinen weiteren signifikanten Anstieg der Serumtransaminaseaktivitäten (siehe Abb. 39), wodurch es im Vergleich zu einem geringeren Ausmaß nekrotischer Bereiche kommt.

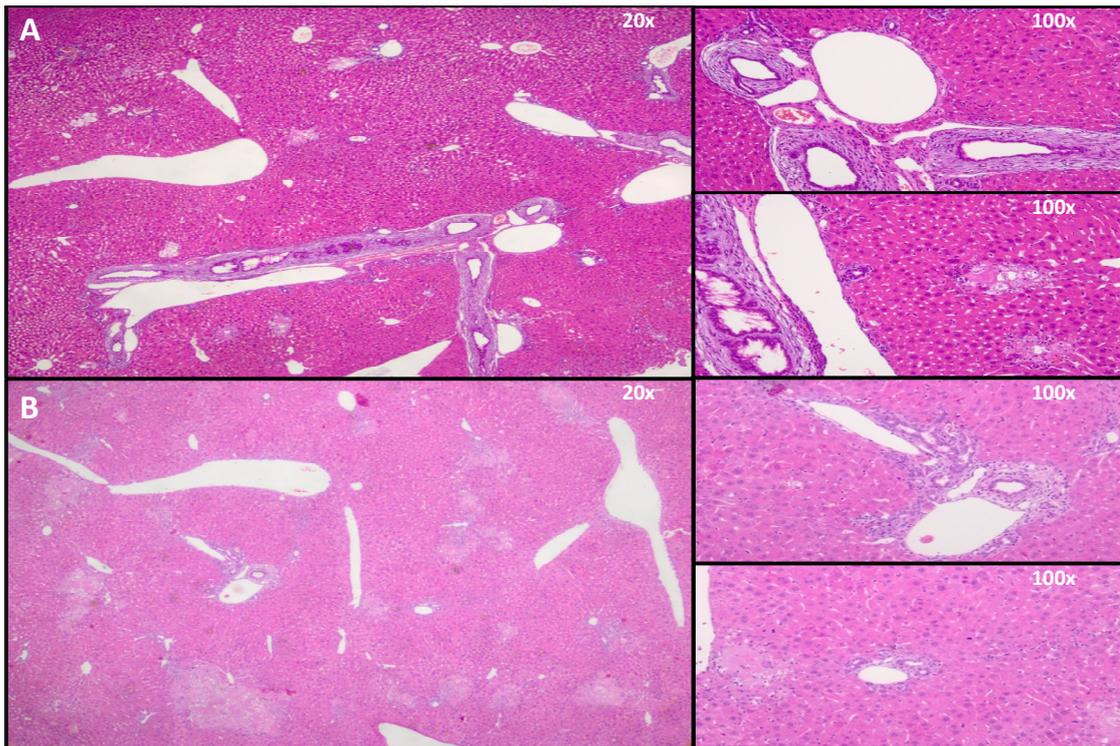


Abb. 40 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+GW4064.

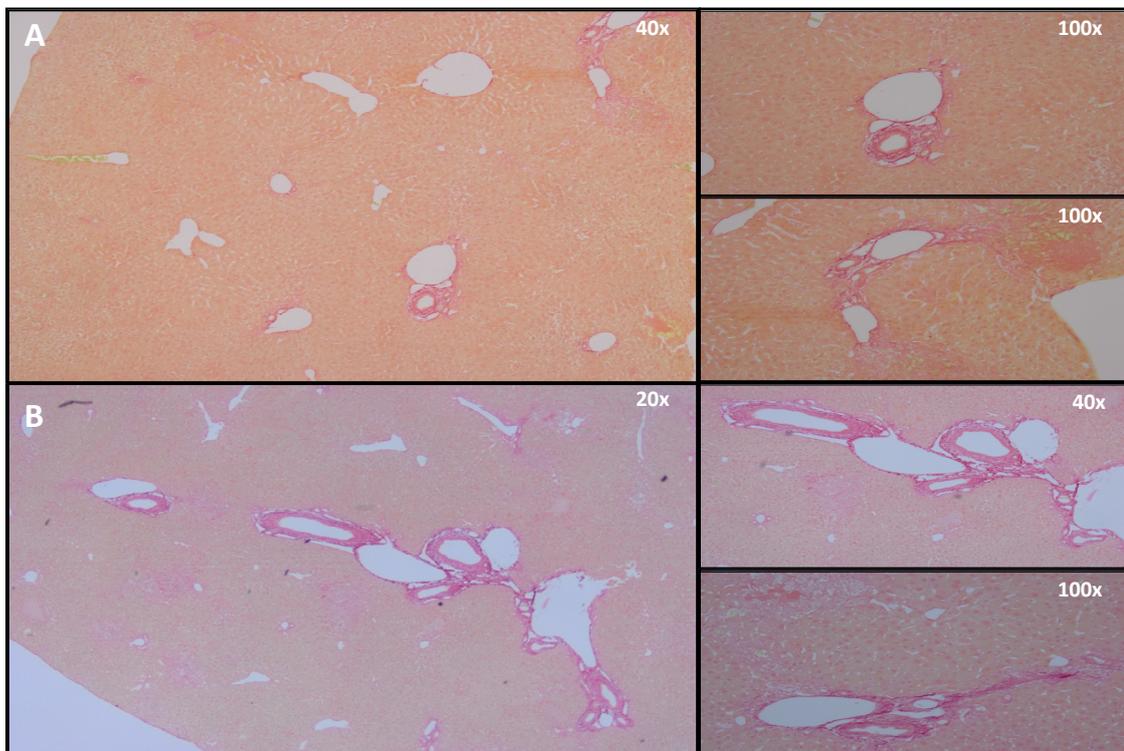


Abb. 41 A+B: Leberhistologie (Sirius-Rot), *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+GW4064.

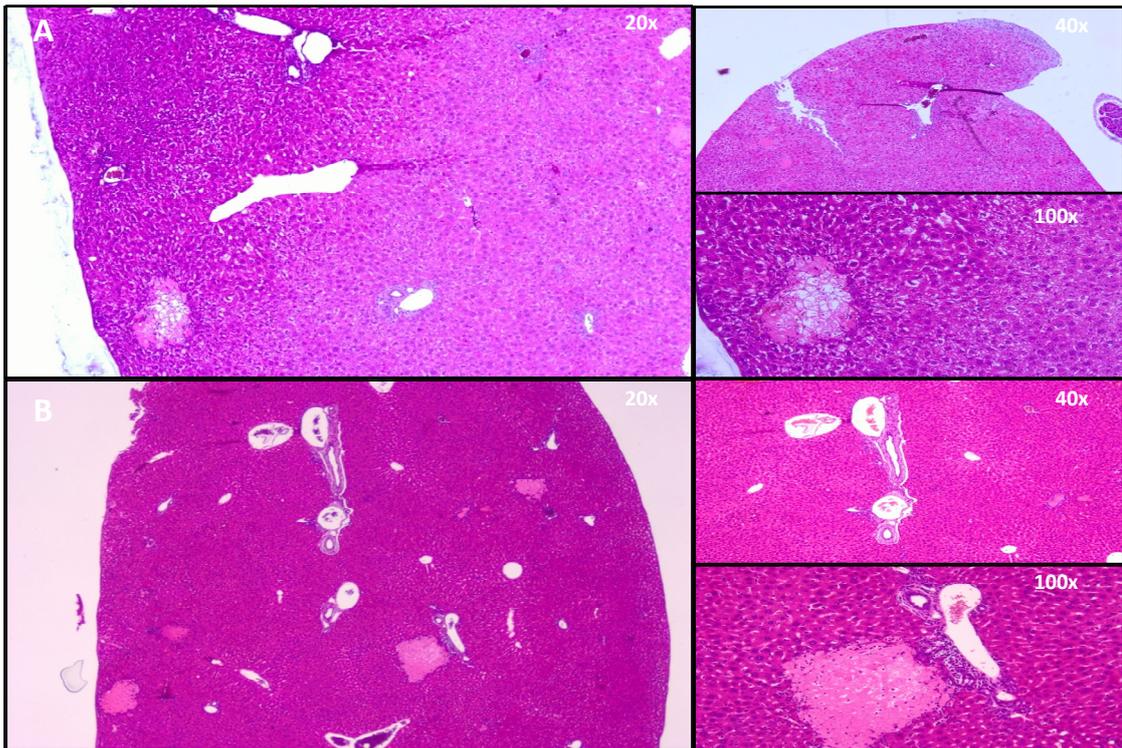


Abb. 42 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+GW4064.

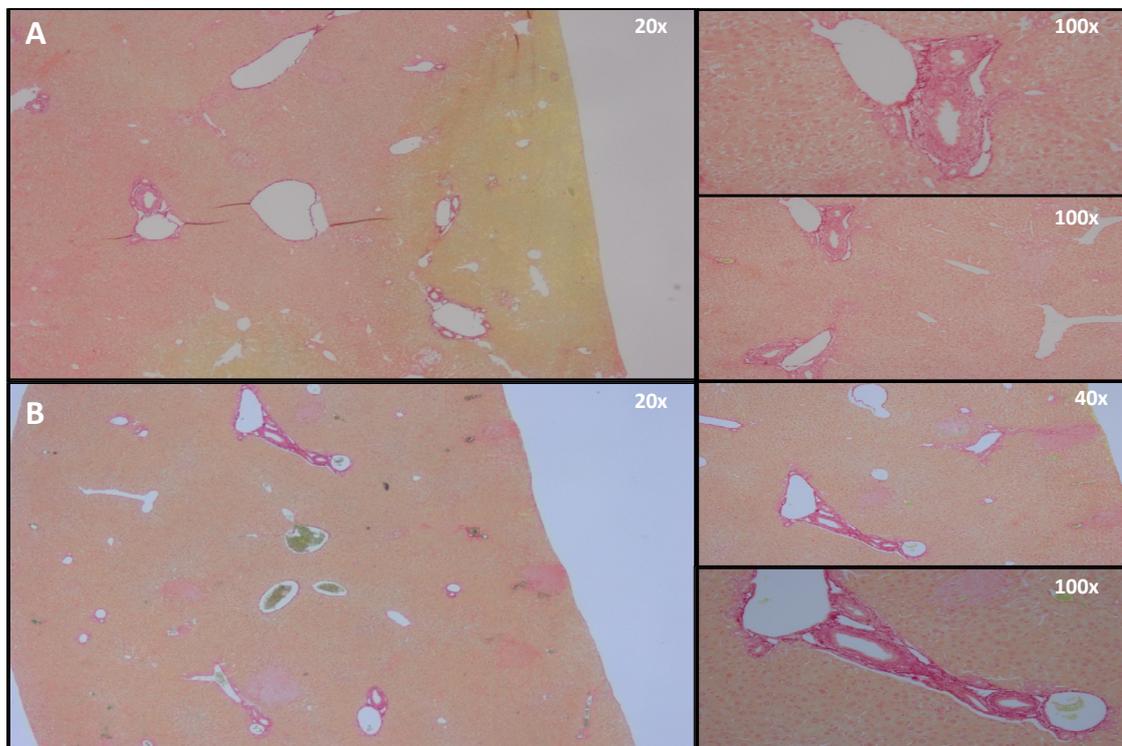


Abb. 43 A+B: Leberhistologie (Sirius-Rot), *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+GW4064.

3.3.3 Hepatische *UGT1A*-Expression nach GW4064-Behandlung bei Cholestase

In Abb. 44 ist die Regulation der hepatischen *UGT1A*-mRNA-Expression in *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach intraperitonealer Behandlung mit GW4064 während einer manifesten Cholestase dargestellt. Während *UGT1A4* und *UGT1A6* keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression aufwiesen, wurde für *UGT1A1* (0,4-fach) und *UGT1A3* (0,3-fach) ein signifikant verringertes Genexpressionslevel beobachtet.

Im Gegensatz dazu zeigen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Behandlung mit GW4064 während der Cholestase eine signifikante Induktion aller hepatischen UGTs (2,2- bis 8,4-fach), wobei die höchste Heraufregulation für *UGT1A1* (8,3-fach) und *UGT1A3* (7,3-fach) gemessen wurde (Abb. 45).

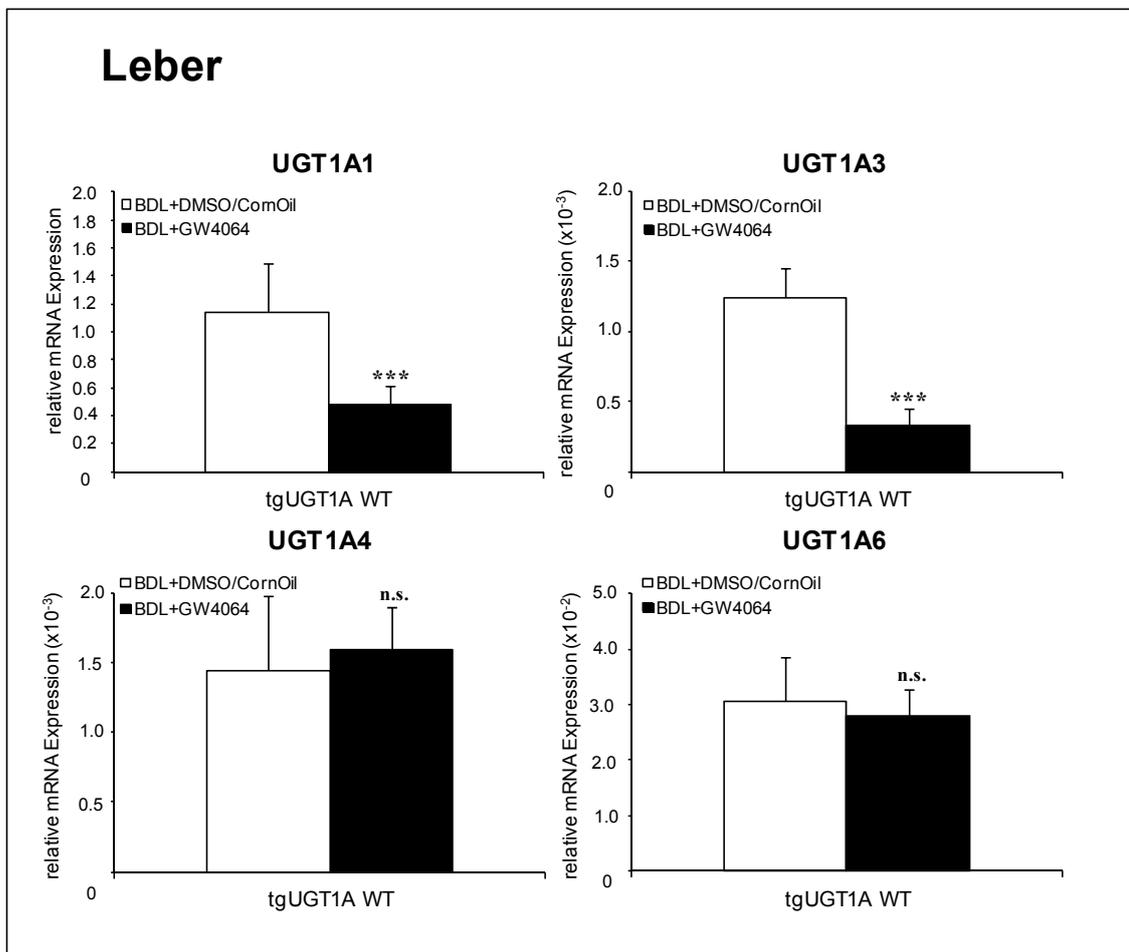


Abb. 44: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, ***: $p > 0,001$.

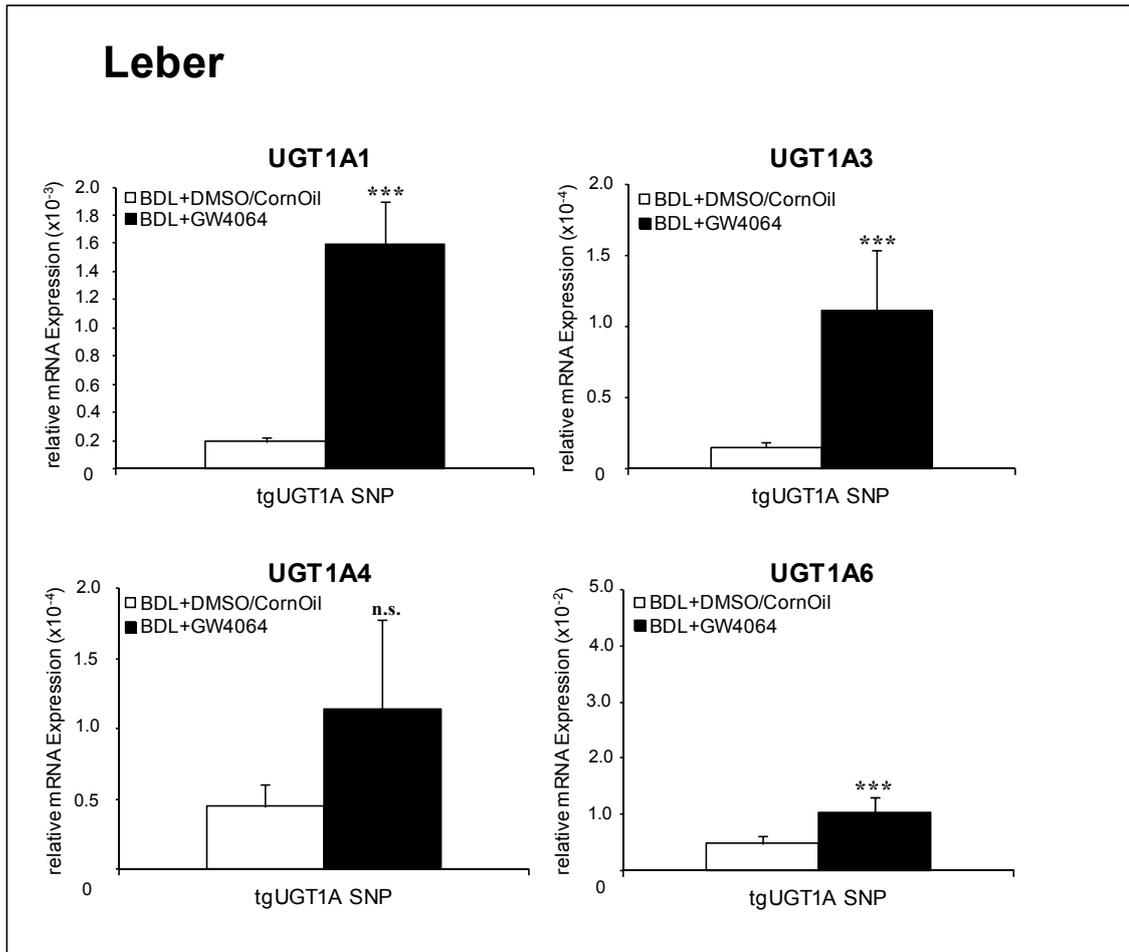


Abb. 45: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, ***: $p > 0,001$.

3.3.4 Extrahepatische *UGT1A*-Expression nach GW4064-Behandlung bei Cholestase

Abb. 46 zeigt die *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum humanisierter *tgUGT1A-WT*-Mäuse im Vergleich zu *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung im Anschluss an eine Gallengangsligatur.

Während für *UGT1A1* (1,3-fach), *UGT1A3* (1,7-fach) und *UGT1A4* (3,9-fach) in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen eine signifikante Induktion der mRNA-Expression festgestellt wurde, zeigten *tgUGT1A-WT*-Mäuse ein verringertes *UGT*-Expressionslevel (*UGT1A1*: 0,5-fach; *UGT1A4*: 0,8-fach; *UGT1A6*: 0,4-fach).

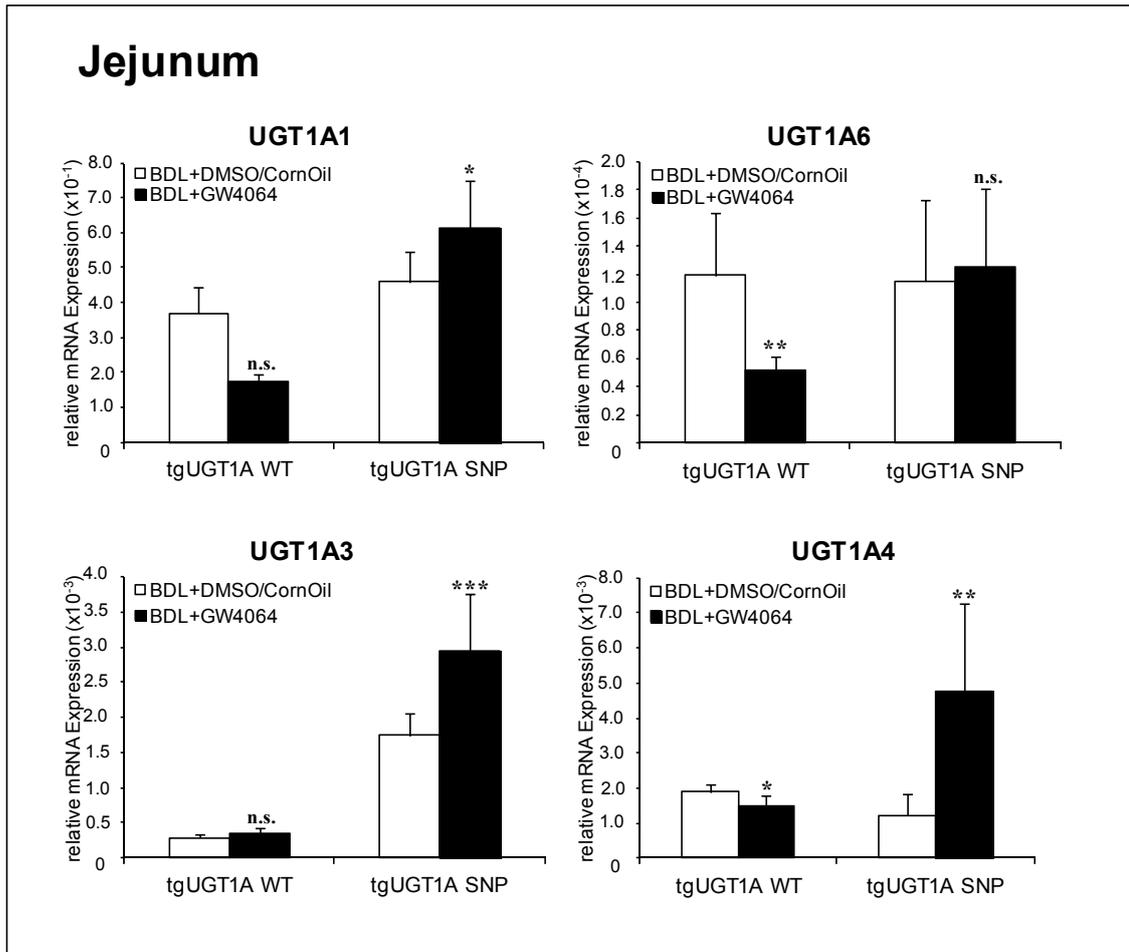


Abb. 46: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, * : $p > 0,001$.**

In Abb. 47 ist die extrahepatische Regulation der *UGT1A*-Gene im Kolon *tgUGT1A-WT*-Mäuse und *-SNP*-Mäuse nach Gallengangsligatur und Behandlung mit GW4064 dargestellt. Analog zum Jejunum konnte auch im Kolon *tgUGT1A-SNP*-Mäuse eine Heraufregulation der *UGT*-Expression detektiert werden (*UGT1A1*: 1,7-fach; *UGT1A4*: 1,4-fach; *UGT1A6*: 1,6-fach). *TgUGT1A-WT*-Mäuse zeigen im Gegensatz dazu neben einer signifikanten Induktion von *UGT1A4* (6,3-fach) und *UGT1A6* (1,4-fach) ein verringertes Genexpressionslevel für *UGT1A1* (0,6-fach).

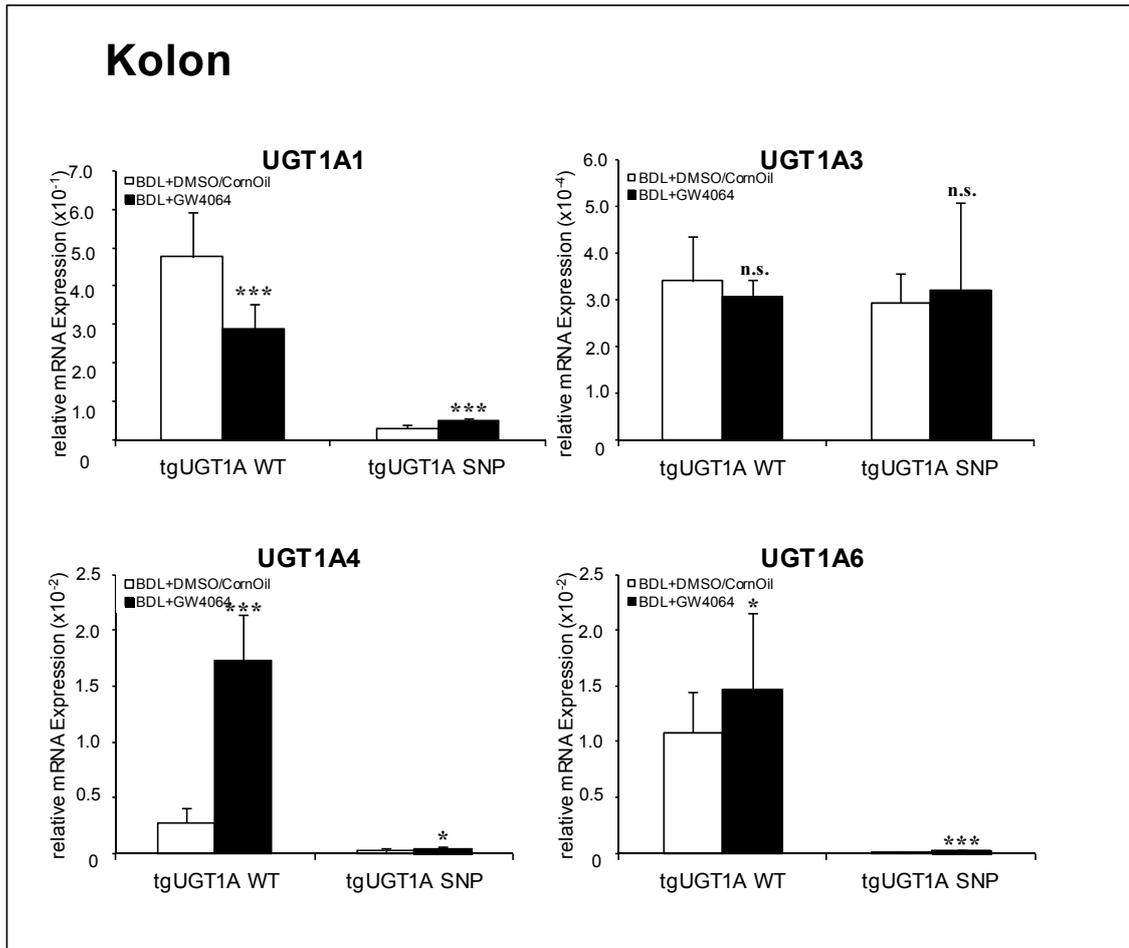


Abb. 47: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Kolon *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, *: $p > 0,001$.**

Insgesamt führte die Behandlung mit GW4064 während der Cholestase bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen lediglich zu einer weiteren Heraufregulation der hepatischen *UGT1A7*-Expression (2,7-fach) sowie der extrahepatischen *UGT1A4*- (6,3-fach) und *UGT1A6*- (1,4-fach)-Expression im Kolon. Darüber hinaus wurden in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen *UGT1A1* (0,4-fach), *UGT1A3* (0,3-fach) und *UGT1A9* (0,4-fach) sowie extrahepatisch *UGT1A1* (Jejunum: 0,5- / Kolon: 0,6-fach), *UGT1A4* (Kolon: 0,8-fach) und *UGT1A6* (Kolon: 0,4-fach) herabreguliert.

Bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen führte die Behandlung mit GW4064 nach Gallengangsligatur neben einer Heraufregulation aller hepatischen *UGT1A*-Gene zu einer Induktion von *UGT1A1*, *UGT1A3* und *UGT1A4* (1,3- bis 3,9-fach) im Jejunum sowie zu einem erhöhten mRNA-Expressionslevel für *UGT1A1*, *UGT1A4* und *UGT1A6* (1,4- bis 1,7-fach) im Kolon.

3.3.5 Hepatische Cytokin-Expression nach GW4064-Behandlung bei Cholestase

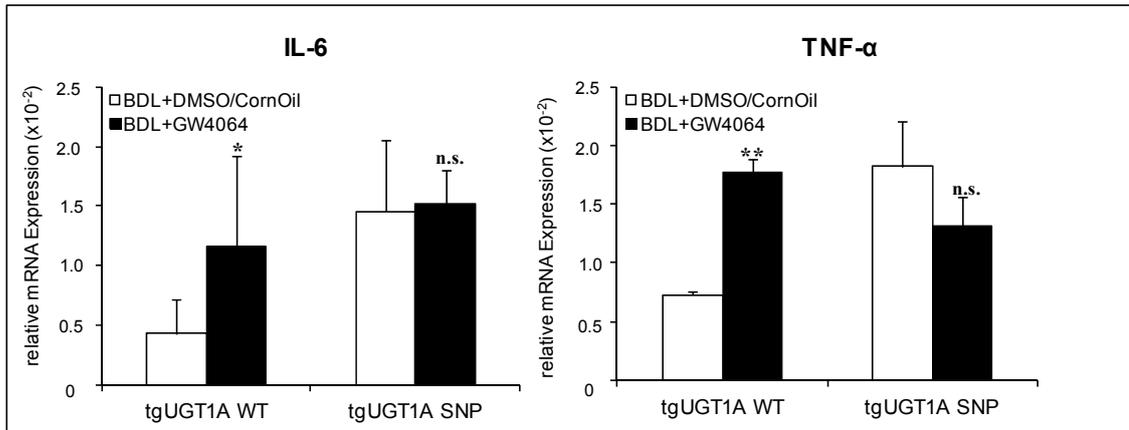


Abb. 48: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, **: $p > 0,01$.

Während in *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase eine signifikante Induktion der hepatischen IL-6- und TNF- α -mRNA-Expression beobachtet wurde (2,7-, 2,4-fach), konnte bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen eine Herabregulation der TNF- α -mRNA-Expression detektiert werden (Abb. 48).

3.3.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren nach GW4064-Behandlung bei Cholestase

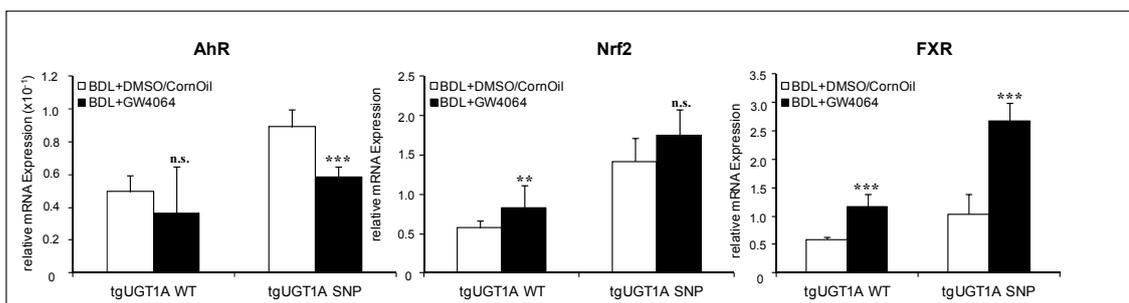


Abb. 49: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, **: $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

In Abb. 49 ist die hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung während der Cholestase dargestellt. Dabei wurde sowohl bei *tgUGT1A-WT*- als auch bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen eine Herabregulation der AhR-mRNA-Expression (0,7-fach) durch die GW4064-Behandlung während der Cholestase detektiert.

Darüber hinaus wurde eine signifikante Induktion der Nrf2-mRNA-Expression bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen (1,5-fach) sowie eine signifikante Heraufregulation der FXR-mRNA-Expression bei *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen gemessen (WT: 2,0-fach, SNP: 2,2-fach).

3.4 TCDD-Behandlung humanisierter *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse bei Cholestase

In früheren Studien (*Kalthoff et al.*, 2010) konnte *in vivo* bereits eine TCDD-induzierte Heraufregulation von humanen *UGT1A*-Genen in *tgUGT1A-WT*-Mäusen gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte daher die Induzierbarkeit der *UGT*-mRNA-Expression in *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen durch TCDD während der Cholestase untersucht werden. Bei vier männlichen *tgUGT1A-WT*- bzw. *SNP*-Mäusen wurde unter Isofluran-Anästhesie eine Ligatur des Gallenganges (BDL) durchgeführt. Innerhalb des postoperativen Beobachtungszeitraums (5 Tage nach BDL) wurden diese Tiere ab 24 Stunden nach BDL einmal täglich vier Tage lang mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) (10 µg/kg/Tag, Vehikel 10% DMSO/ 90% Corn Oil) i.p. injiziert. Als Kontrolle dienten jeweils zwei *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse, die ab 24 Stunden nach BDL vier Tage lang mit 10% DMSO / 90% Corn Oil i.p. injiziert wurden.

3.4.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach TCDD-Behandlung bei Cholestase

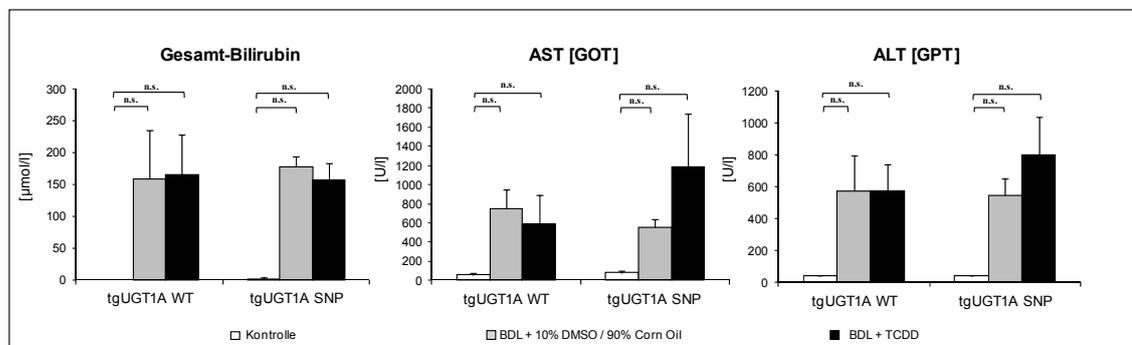


Abb. 50: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant.

Durch TCDD-Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse während der Cholestase konnte keine Verringerung des Bilirubinlevels im Vergleich zur Kontrollgruppe (BDL+DMSO/Corn Oil) erzielt werden. Des Weiteren zeigten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach TCDD-Behandlung während der Cholestase im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen erhöhte Transaminaseaktivitäten (AST: 2,1-fach, ALT: 1,5-fach) (Abb. 50).

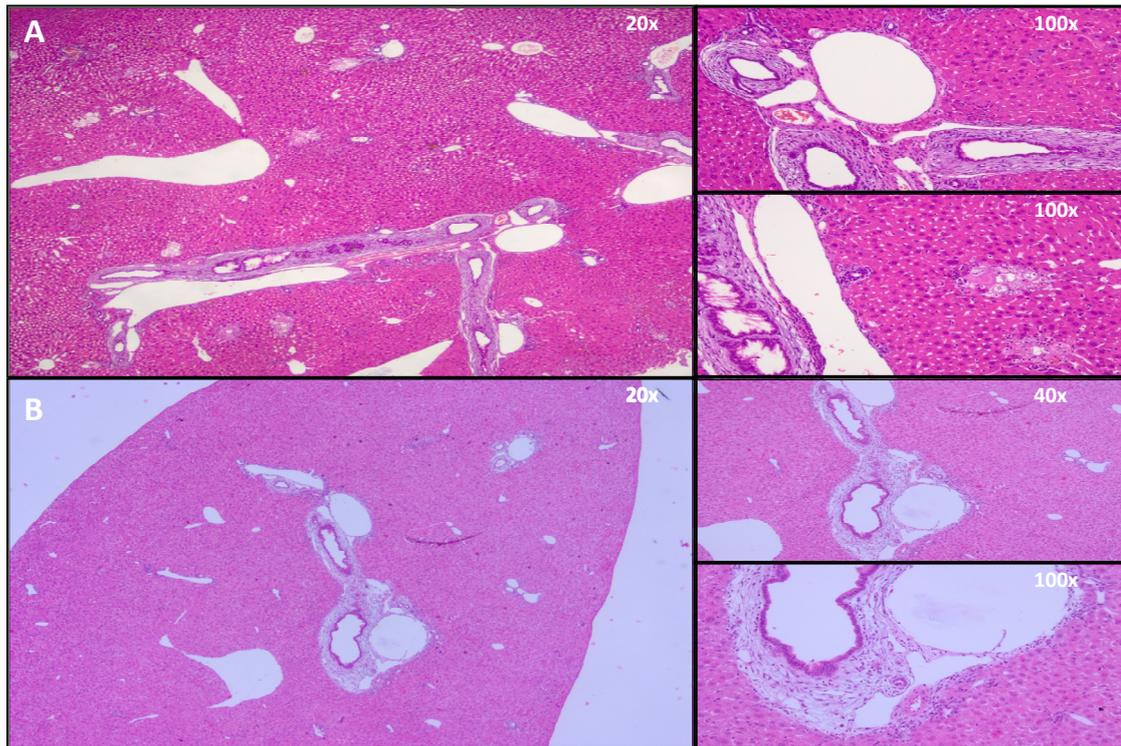
3.4.2 Histologie der Leber nach TCDD-Behandlung bei Cholestase

Abb. 51 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+TCDD.

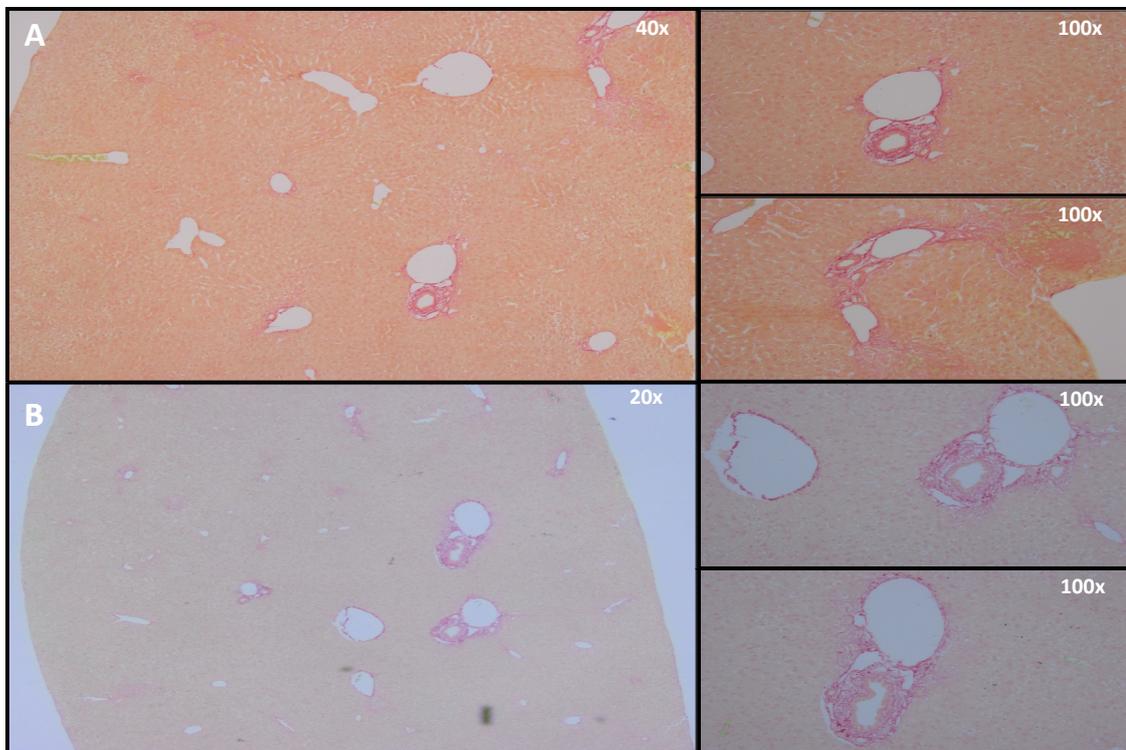


Abb. 52 A+B: Leberhistologie (Sirius-Rot), *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+TCDD.

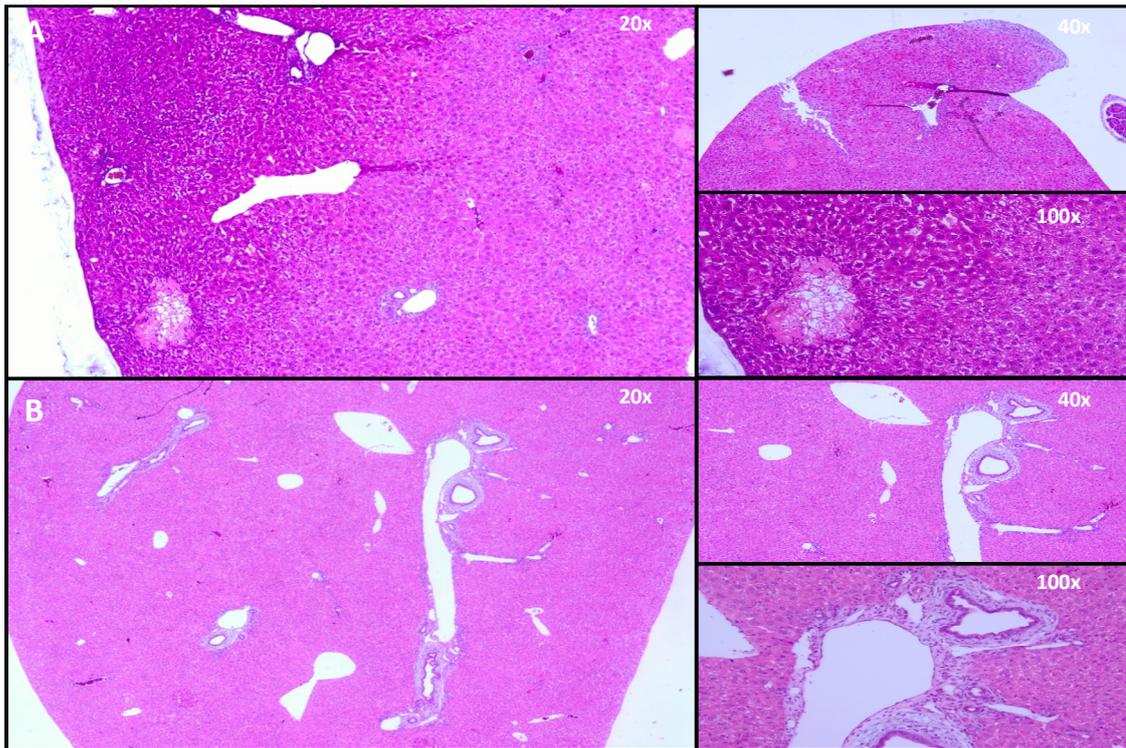


Abb. 53 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A*-SNP-Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+TCDD.

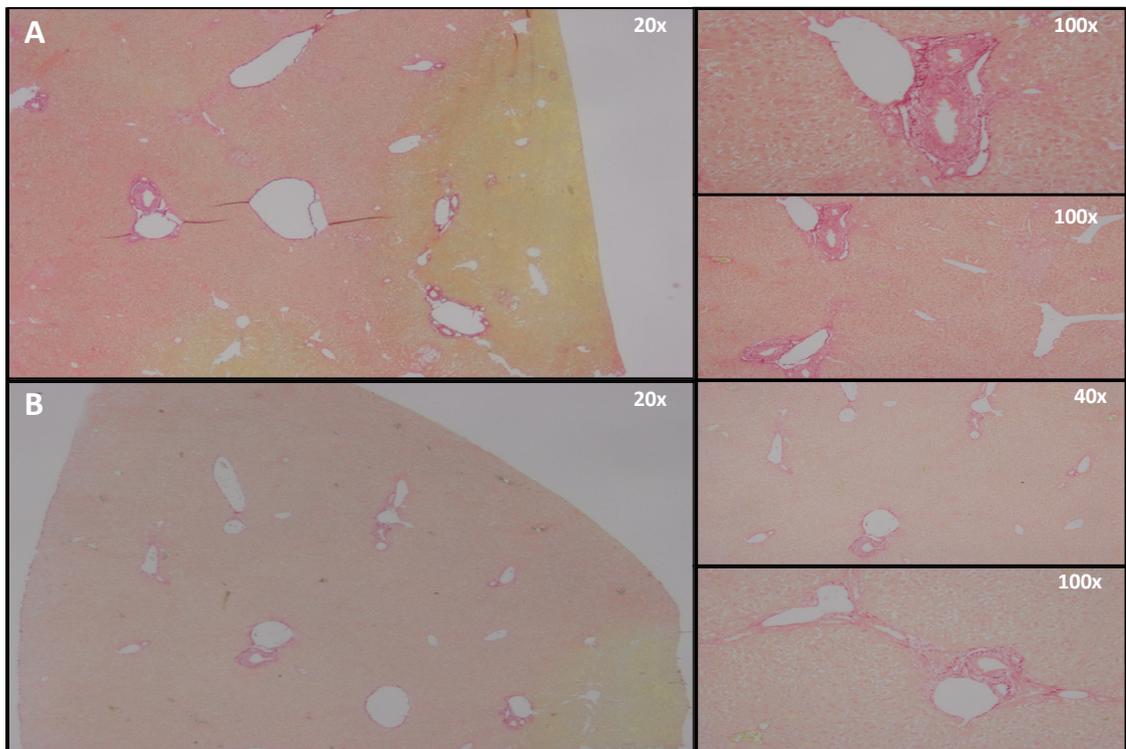


Abb. 54 A+B: Leberhistologie (Sirius-Rot), *tgUGT1A*-SNP-Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. (A) BDL+DMSO/Corn Oil, (B) BDL+TCDD.

Im Vergleich zu Kontrolltieren, denen intraperitoneal vier Tage lang 10% DMSO / 90% Corn Oil nach BDL verabreicht wurde, zeigten cholestatische *tgUGT1A-WT* – und –*SNP*-Mäuse nach TCDD-Behandlung histologisch keine Verringerung der mit einer Cholestase einhergehenden Fibrose, jedoch weniger stark nekrotische Bereiche (Vgl. Abb. 51+52 A+B und 53+54 A+B). Insgesamt wiesen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse eine höhere Anzahl nekrotischer Bereiche nach TCDD-Behandlung bei Cholestase auf als *tgUGT1A-WT*-Mäuse. Dies steht wiederum in Korrelation zu den erhöhten Serumtransaminaseaktivitäten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse gegenüber denen *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach TCDD-Behandlung während der Cholestase (Abb. 50).

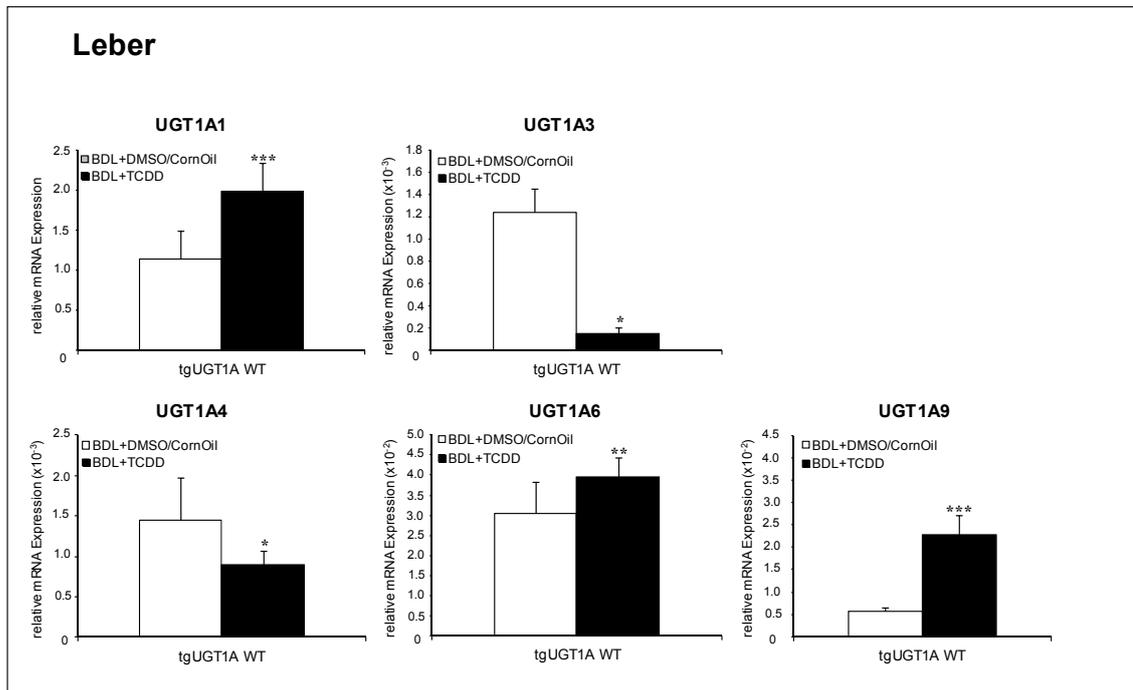
3.4.3 Hepatische *UGT1A*-Expression nach TCDD-Behandlung bei Cholestase

Abb. 55: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

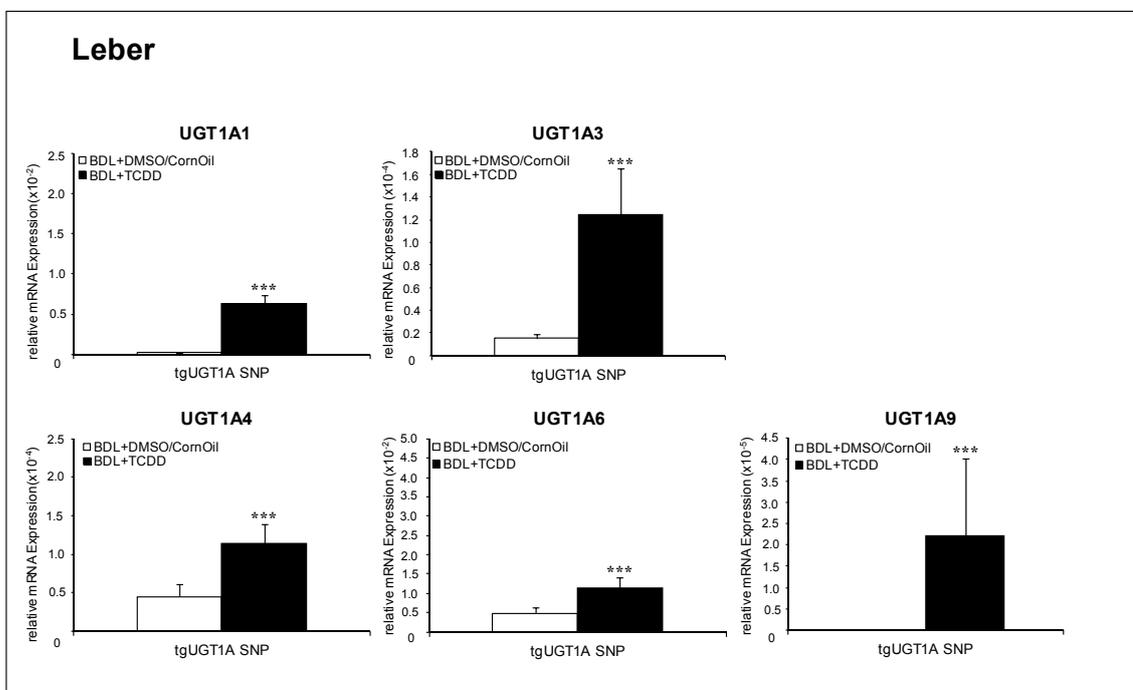


Abb. 56: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. SNP: Mutante, ***: $p > 0,001$.

In Abb. 55 ist die Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Cholestase dargestellt. Während *UGT1A1*, *UGT1A6* und *UGT1A9* signifikant induziert wurden (1,7-, 1,3- und 4,0-fach), zeigten *UGT1A3* und *UGT1A4* eine deutlich verringerte mRNA-Expression (jeweils 0,6-fach). In *tgUGT1A-SNP*-Mäusen konnte im Gegensatz dazu eine signifikante Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene nach Behandlung mit TCDD während der Cholestase detektiert werden (2,4- bis 33-fach) (siehe Abb. 56).

3.4.4 Extrahepatische *UGT1A*-Expression nach Behandlung mit TCDD bei Cholestase

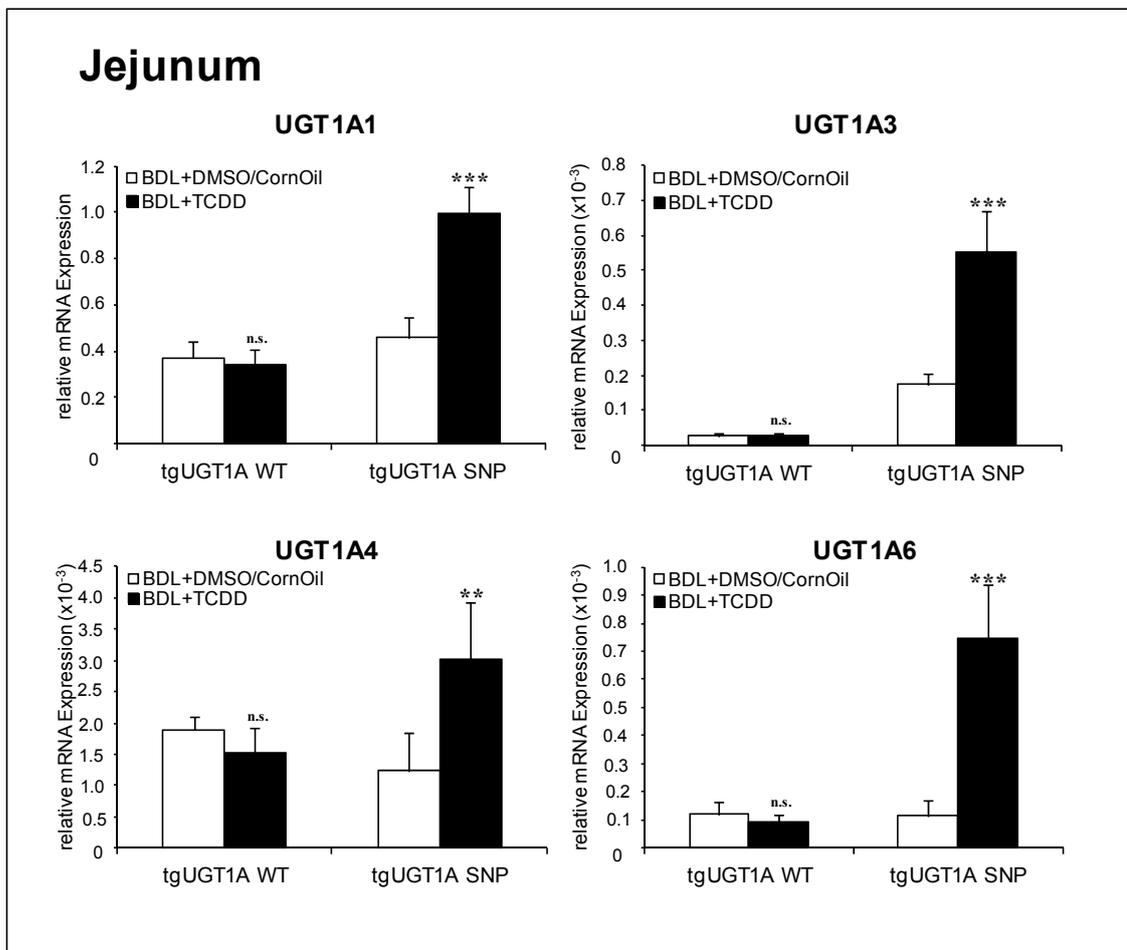


Abb. 57: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum von *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, **: $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

Während die *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum TCDD-behandelter *tgUGT1A-WT*-Mäuse während der Cholestase unverändert blieb, wurde wiederum eine signifikante Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen beobachtet (2,2- bis 6,4-fach) (Abb. 57).

Im Kolon *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse wurde nach TCDD-Behandlung während der Cholestase eine signifikante Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene gemessen (*UGT1A1*: 4,9-, 4,7-fach; *UGT1A3*: 4,5-, 7,4-fach; *UGT1A4*: 10,1-, 7,7-fach; *UGT1A6*: 5,6-, 24,2-fach; *UGT1A7* (7,4-fach). Die stärkste Induktion wurde hierbei in *tgUGT1A-WT*-Mäusen für *UGT1A4* und in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen für *UGT1A6* festgestellt (Abb. 58).

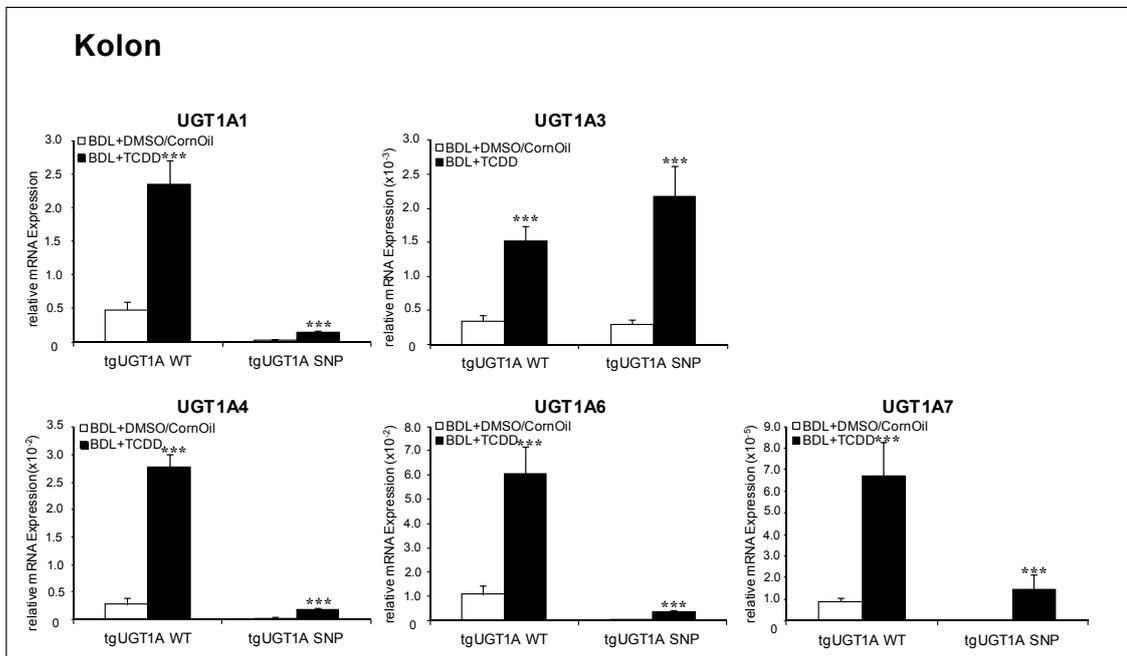


Abb. 58: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Kolon von humanisierten *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, ***: $p > 0,001$.

3.4.5 Hepatische Cytokin-Expression nach TCDD-Behandlung bei Cholestase

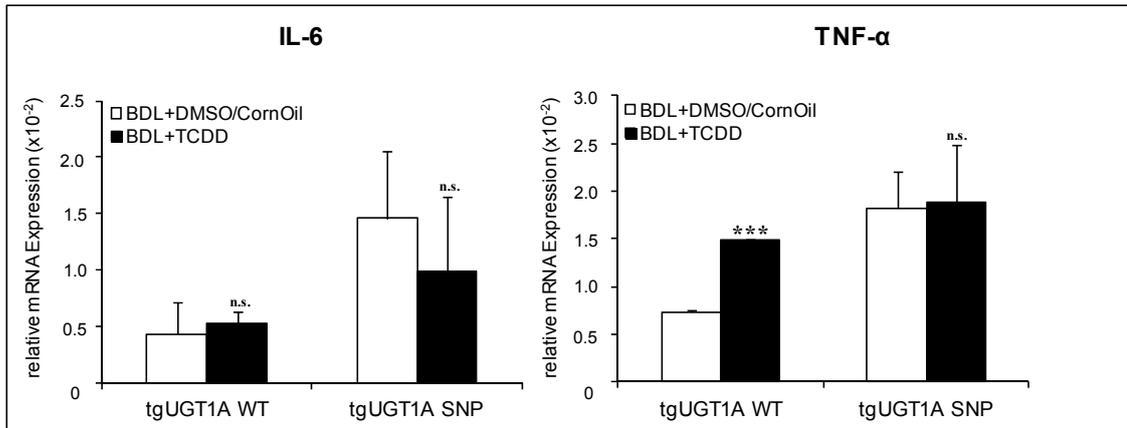


Abb. 59: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, ***: $p > 0,001$.

Die TCDD-Behandlung während der Cholestase führte zu einer signifikanten Heraufregulation der TNF- α -mRNA-Expression (2,0-fach) bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen und einer verringerten IL-6-Expression bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen (Abb. 59).

3.4.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren nach TCDD-Behandlung bei Cholestase

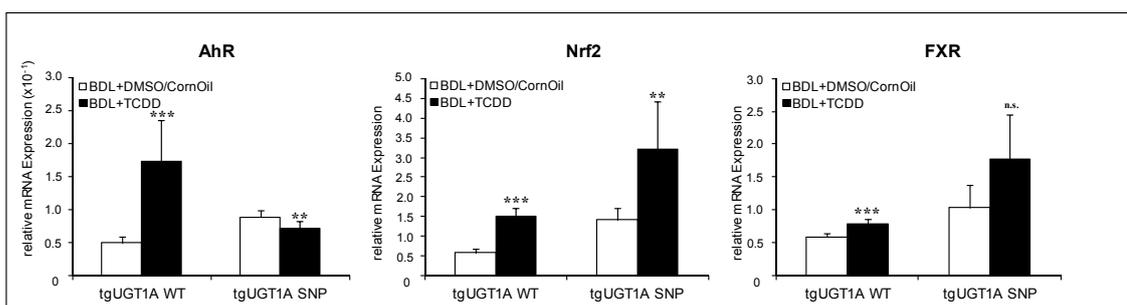


Abb. 60: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, **: $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

Abb. 60 zeigt die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in der Leber von *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Cholestase. Während in *tgUGT1A-WT*-Mäusen alle Transkriptionsfaktoren

signifikant induziert wurden (AhR 3,5-fach, Nrf2 2,7-fach, FXR 1,3-fach), konnte in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen neben einer deutlichen Heraufregulation der Nrf2- und FXR-mRNA-Expression (2,3-, 1,7-fach) eine signifikante Abnahme der AhR-mRNA-Expression (0,8-fach) gemessen werden.

3.5 Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx) in humanisierten transgenen *UGT1A*-Mäusen

Zur Analyse der Regulation hepatischer und extrahepatischer UDP-Glukuronosyltransferasen nach partieller Hepatektomie (Leberteileresektion, PHx) sollte zunächst bestimmt werden, ob und nach welcher Zeit UGTs im Rahmen der Leberregeneration induziert werden. Daher wurde bei jeweils vier weiblichen *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäusen eine partielle Hepatektomie durchgeführt. Zwecks Serumanalyse und Entnahme von Organen zur Genexpressionsanalyse wurden die Tiere postoperativ nach verschiedenen Zeiträumen (6h, 24h, 48h, 72h, 120h) getötet. Als Kontrollgruppe dienten Sham-operierte Tiere (n=2). Insgesamt wurden für die Versuche jeweils 20 WT-/SNP-Mäuse PHx und 10 Tiere Sham operiert.

Die aus den Organen (Leber, Jejunum, Kolon) der Versuchstiere gewonnene mRNA wurde mittels RT-PCR in cDNA für die Real-time-PCR-Analyse transkribiert, wobei beta-Actin als interne Kontrolle diente.

3.5.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel während der Leberregeneration nach PHx

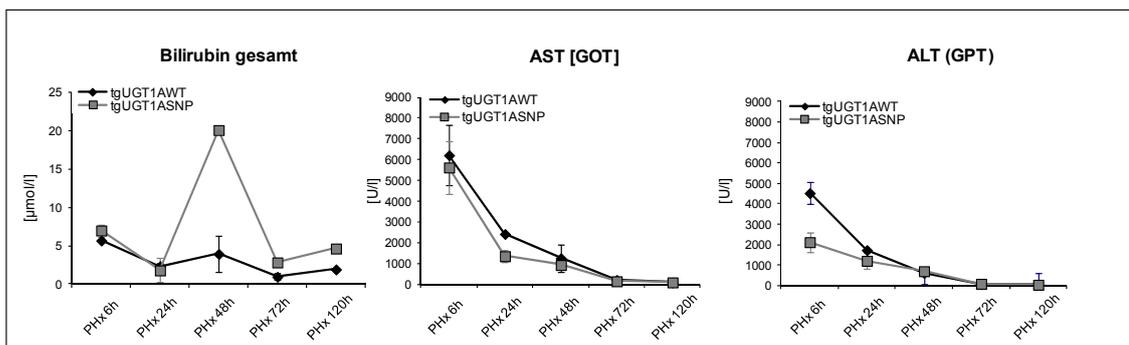


Abb. 61: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 6h-120h). WT: Wildtyp, SNP: Mutante.

Durch die partielle Hepatektomie (6-120h) kommt es bei *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Transaminaseaktivitäten (WT: AST 4,4- bis 26-fach, ALT 3,8- bis 45-fach; SNP: AST 3,2- bis 17-fach, ALT 4,3- bis 36-fach), die sich jedoch postoperativ innerhalb von fünf Tagen wieder normalisierten (Abb. 61). In der frühen postoperativen Phase (PHx6h) wiesen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse zudem eine

signifikant höhere ALT-Aktivität im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen auf.

Sechs und 48 Stunden nach Hepatektomie wurde darüber hinaus ein signifikant erhöhtes Bilirubinlevel bei *tgUGT1A-WT*- (PHx6h: 2,9-fach, PHx48h: 2,0-fach) und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen (Phx6h: 3,5-fach, PHx48h: 9,1-fach) gemessen, wobei zum Zeitpunkt PHx48h in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen ein deutlich höheres Gesamtbilirubin im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen detektiert wurde.

3.5.2 Histologie der Leber während der Leberregeneration nach PHx

Während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zeigten *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse z.T. fibröse Erweiterungen (Symbol Pfeil) im Bereich des Portalfeldes sowie Nekrosen (Symbol Stern) (Abb. 63). Darüber hinaus wurde in der Leberhistologie (HE) *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse sowohl eine mikro- als auch makrovesikuläre Fetteinlagerung im Anschluss an die partielle Hepatektomie beobachtet.

Durch immunhistochemischen Nachweis des zellproliferationsassoziierten Antigens Ki-67 konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil mitotisch aktiver Hepatozyten („Wachstumsfraktion“) in *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen 72 Stunden (*tgUGT1A-WT*) bzw. 48 bis 72 Stunden (*tgUGT1A-SNP*) nach partieller Hepatektomie am Größten ist (Abb.62 und Abb. 64).

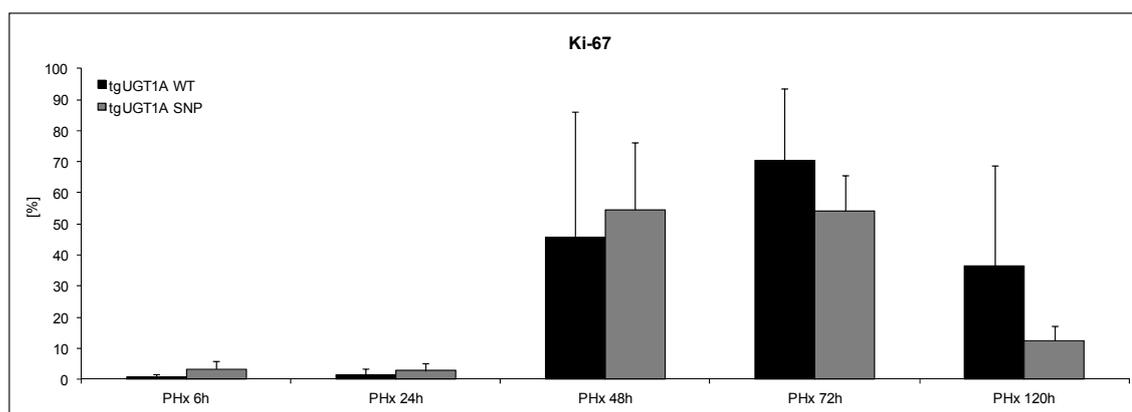


Abb. 62: Prozentualer Anteil Ki-67-positiver Nuklei in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx). WT: Wildtyp, SNP: Mutante.

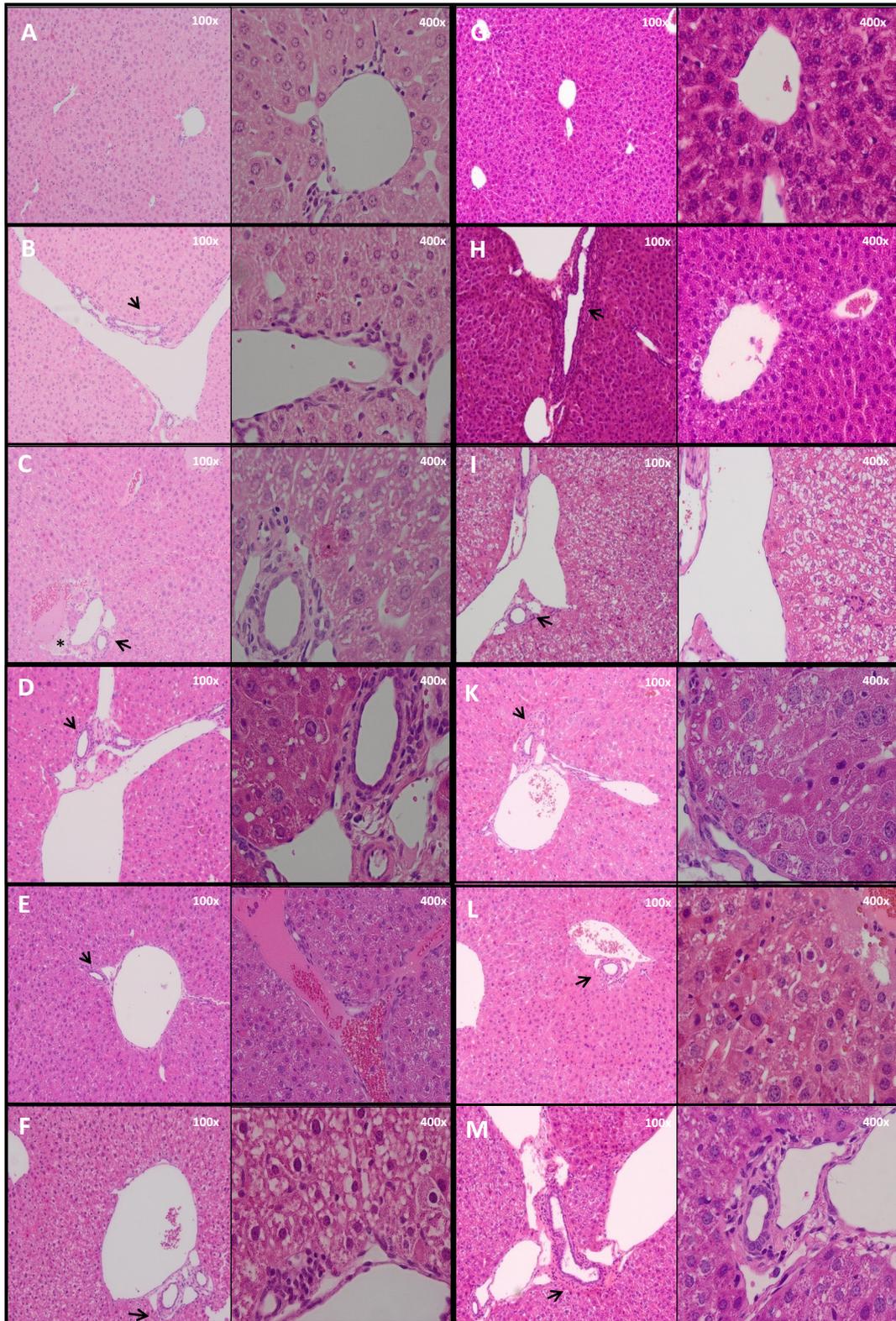


Abb. 63: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A*-WT- und -SNP-Mäuse nach Sham-Operation (A+G) bzw. partieller Hepatektomie (6h/24h/48h/72h/120h, WT: B-F, SNP: H-M).

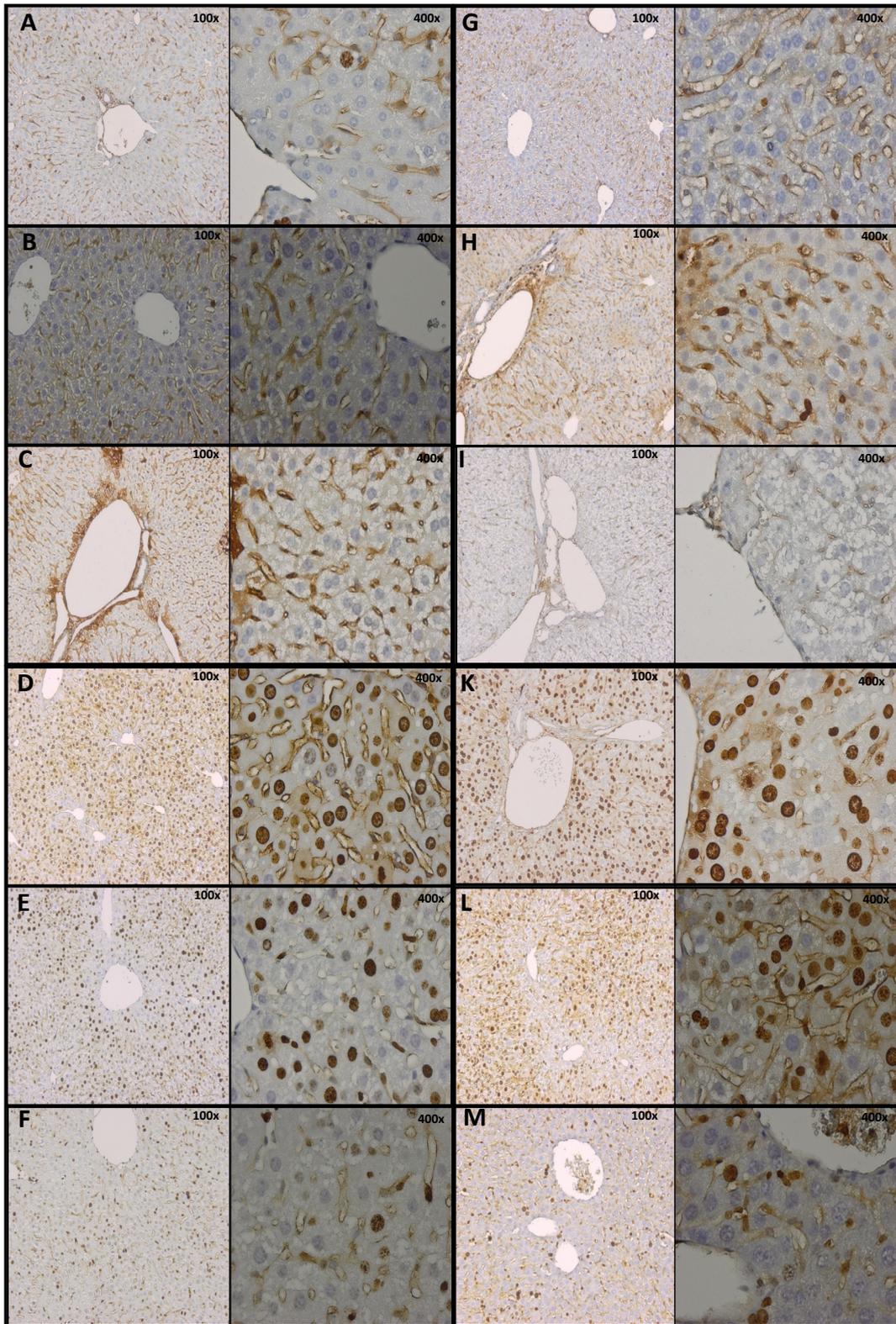


Abb. 64: Ki-67-Immunohistochemie, *tgUGT1A*-WT- und -SNP-Mäuse nach Sham-Operation (A+G) bzw. partieller Hepatektomie (6h/24h/48h/72h/120h, WT: B-F, SNP: H-M).

3.5.3 Hepatische *UGT1A*-Expression während der Leberregeneration nach PHx

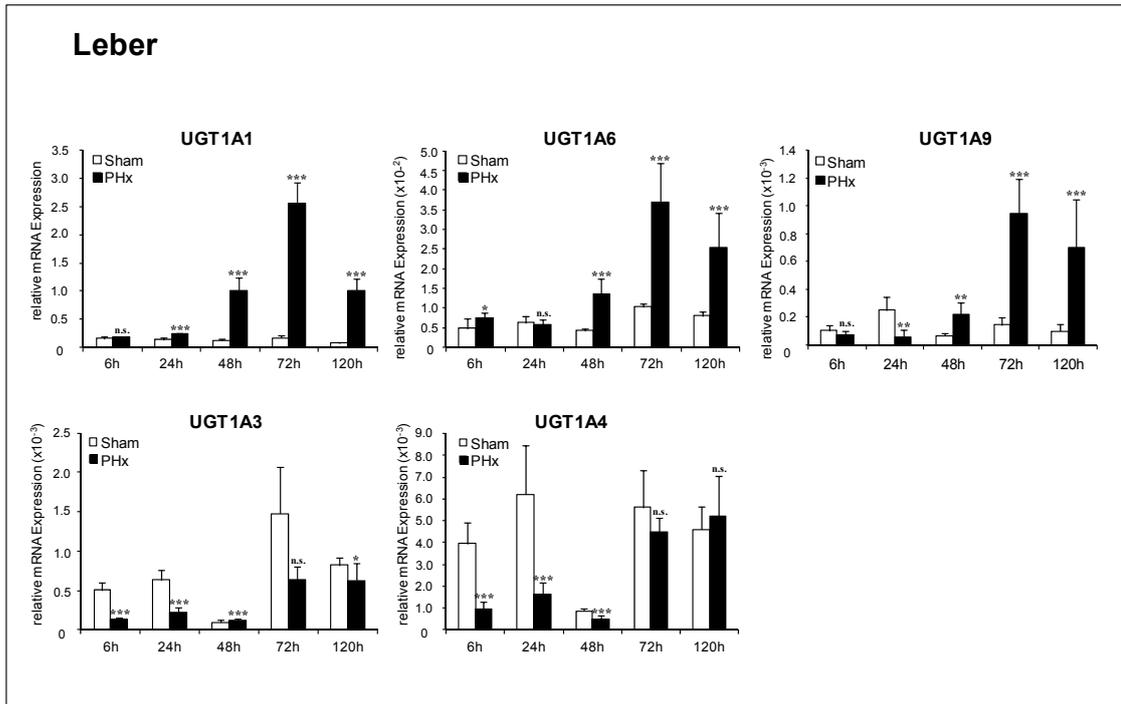


Abb. 65: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen während der Leberregeneration nach PHx. n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *: $p > 0,001$.**

Abb. 65 zeigt die hepatische *UGT1A*-mRNA-Expression *tgUGT1A-WT*-Mäuse während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx 6h-120h).

Dabei wurde eine signifikante Induktion der mRNA-Expression für *UGT1A1* (24h: 1,7-fach, 48h: 8,4-fach, 72h: 15,8-fach, 120h: 13,7-fach), *UGT1A6* (6h: 1,6-fach, 48h: 3,2-fach, 72h: 3,6-fach, 120h: 3,2-fach) und *UGT1A9* (48h: 3,5-fach, 72h: 6,6-fach, 120h: 7,1-fach) detektiert. Im Gegensatz dazu wurde während der Leberregeneration eine deutlich geringere mRNA-Expression für *UGT1A3* (0,3-0,9-fach) und *UGT1A4* (0,2- bis 0,8-fach) gemessen.

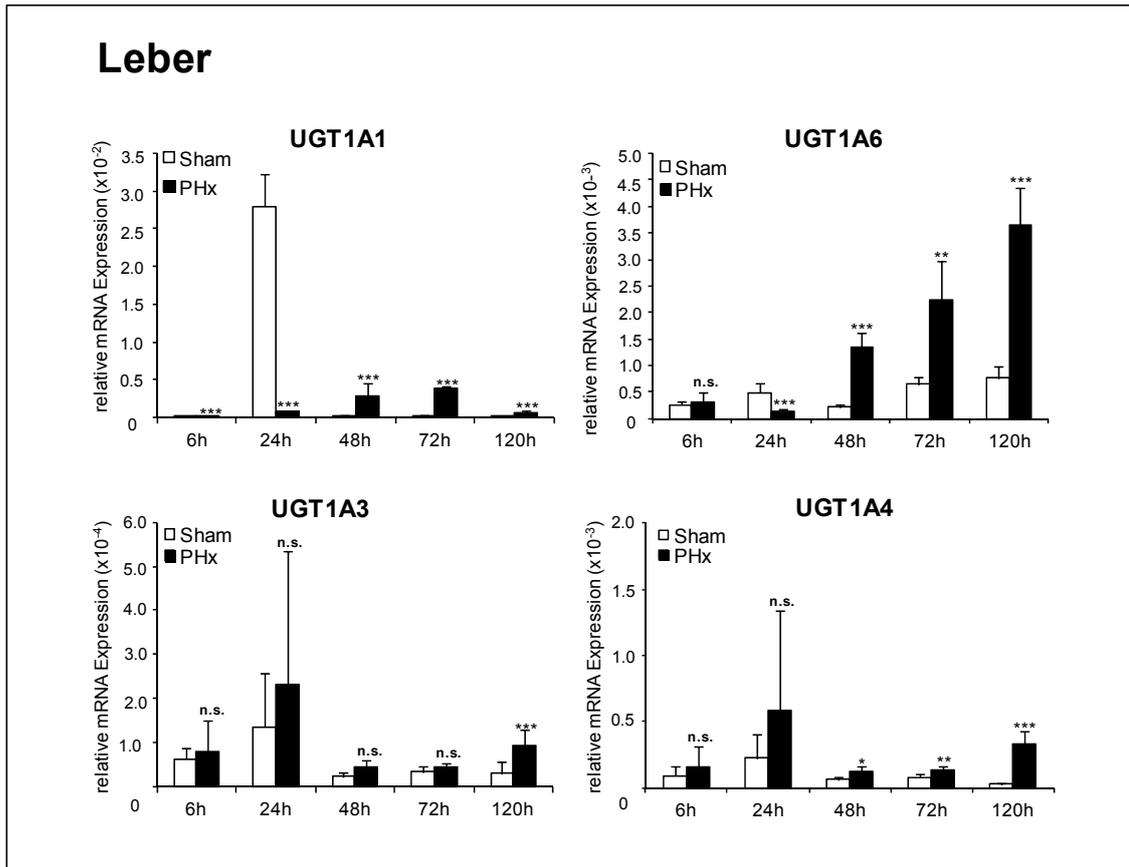


Abb. 66: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen während der Leberregeneration nach PHx. n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

Bereits in der frühen postoperativen Phase wurden bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie, mit Ausnahme von *UGT1A1* (PHx6h: 0,4-fach) und *UGT1A9* (PHx6h-120h: nicht determinierbar), alle hepatischen *UGT1A*-Gene induziert (1,3- bis 1,6-fach) (Abb. 66).

Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen konnte neben einer signifikanten Heraufregulation für *UGT1A1* (PHx48h: 14,8-fach, PHx72h: 18,8-fach, PHx120h: 8,9-fach) und *UGT1A6* (PHx48h: 6,3-fach, PHx72h: 3,5-fach, PHx120h: 4,8-fach) auch ein deutlich erhöhtes mRNA-Expressionslevel für *UGT1A3* (PHx48h: 1,9-fach, PHx72h: 1,3-fach, PHx120h: 3,1-fach) und *UGT1A4* (PHx24h: 2,2-fach, PHx48h: 1,9-fach, PHx72h: 1,7-fach, PHx120h: 11,8-fach) detektiert werden.

Darüber hinaus wurde 24 Stunden nach partieller Hepatektomie eine signifikante Verringerung der *UGT1A*-Expression für *UGT1A1* (PHx24h: 0,03-fach) und *UGT1A6* (0,3-fach) beobachtet, wobei das *UGT1A1*-Expressionslevel der Sham-operierten Kontrollen nach 24 Stunden im Vergleich zum *UGT1A1*-Expressionslevel der Kontrollen zu einem anderen Zeitpunkt deutlich erhöht war.

3.5.4 Extrahepatische *UGT1A*-Expression während der Leberregeneration nach PHx

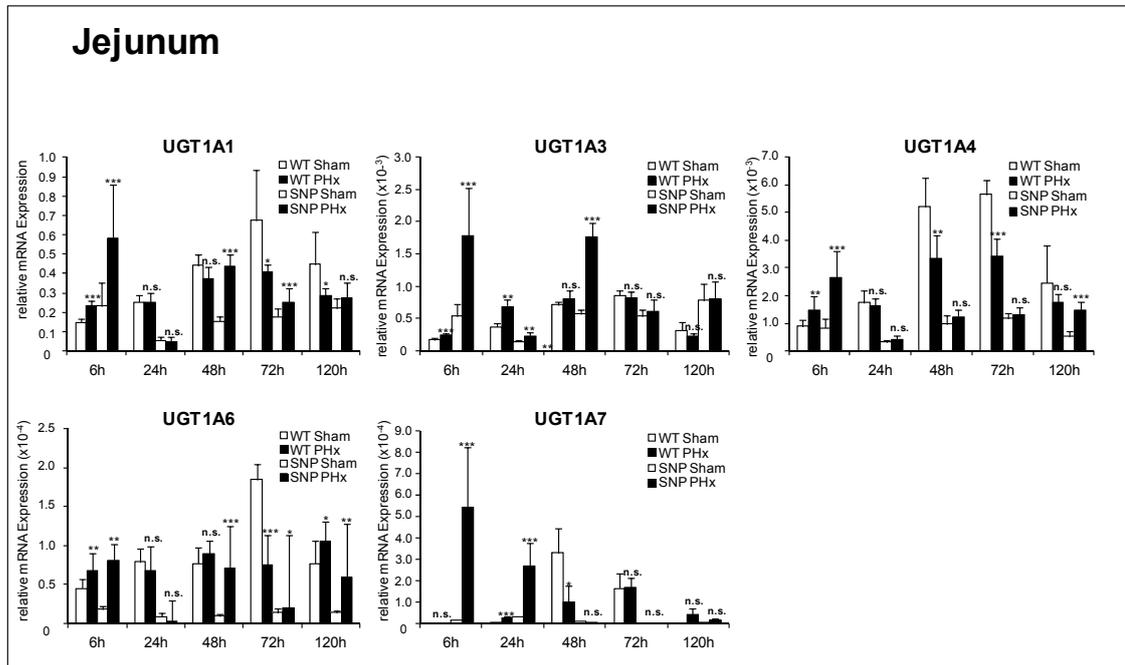


Abb. 67: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen während der Leberregeneration nach PHx. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

In Abb. 67 ist die mRNA-Expression im Jejunum *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx 6h-120h) dargestellt. In *tgUGT1A-WT*-Mäusen konnte eine signifikante Induktion der mRNA-Expression dabei lediglich in der frühen postoperativen Phase für *UGT1A1* (6h: 1,6-fach), *UGT1A3* (6h: 1,4-fach, 24h: 1,9-fach), *UGT1A4* (6h: 1,6-fach), *UGT1A6* (6h: 1,5-fach, 120h: 1,4-fach), *UGT1A7* (24h: 12,2-fach) beobachtet werden. Des Weiteren wurde eine im Vergleich zu Sham-operierten Versuchstieren deutlich geringere mRNA-Expression für *UGT1A1* (72h: 0,6-fach, 120h: 0,6-fach), *UGT1A4* (48h: 0,6-fach, 72h: 0,6-fach), *UGT1A6* (72h: 0,4-fach) und *UGT1A7* (48h: 0,3-fach) gemessen. Im Jejunum *tgUGT1A-SNP*-Mäuse wurde in der frühen postoperativen nach PHx ebenfalls eine Heraufregulation extrahepatisch exprimierter UGTs (2,5- bis 37-fach) detektiert. Darüber hinaus konnte eine Induktion der *UGT1A*-mRNA-Expression 24, 48, 72 Stunden bzw. fünf Tage nach partieller Hepatektomie beobachtet werden (1,3- bis 8,8-fach, 1,3- bis 7,1-fach, 1,1- bis 1,4-fach, 1,2- bis 4,7-fach). Eine Ausnahme bildeten *UGT1A1*, *UGT1A6* (24h: 0,9-, 0,4-fach) und *UGT1A7* (48h: 0,4-fach).

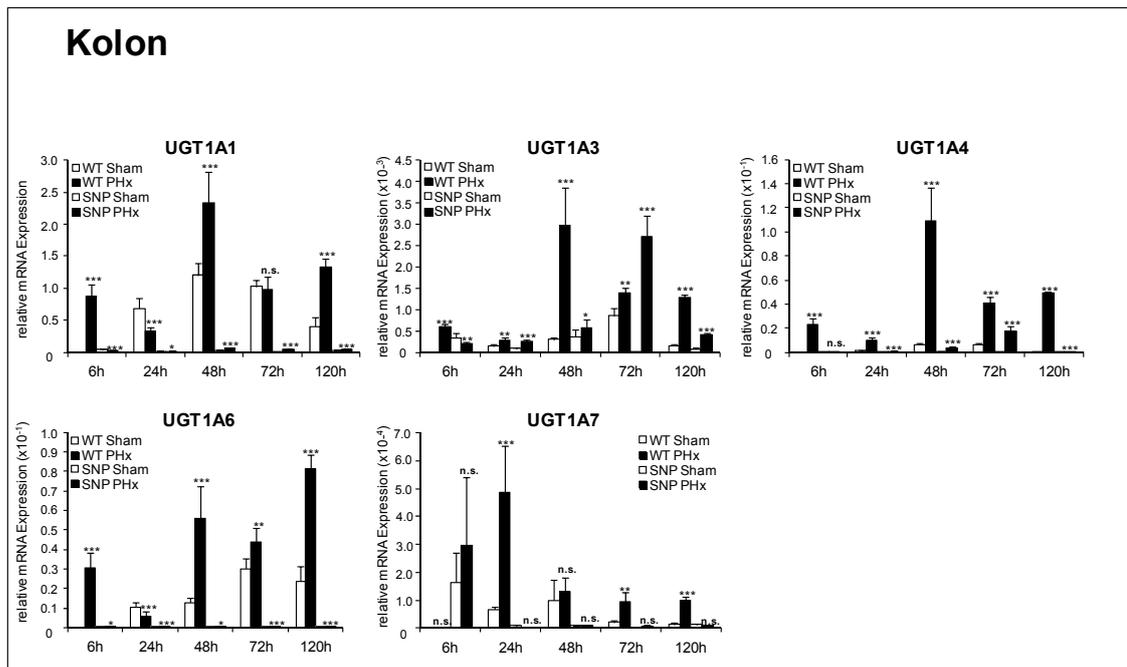


Abb. 68: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Kolon von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen während der Leberregeneration nach PHx. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *: $p > 0,001$.**

Abb. 68 zeigt die mRNA-Expression im Kolon *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx 6h-120h). Mit Ausnahme von *UGT1A1* (PHx 24h: 0,5-fach, PHx72h: 0,9-fach) und *UGT1A6* (PHx24h: 0,6-fach) wurden bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen alle UGTs signifikant induziert (*UGT1A1*: 1,9- bis 3,3-fach, *UGT1A3*: 1,9- bis 9,8-fach, *UGT1A4*: 6,4- bis 117-fach, *UGT1A6*: 1,5- bis 4,4-fach, *UGT1A7*: 1,3- bis 7,3-fach).

Im Gegensatz dazu wurde bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen in der frühen postoperativen Phase (PHx6h), mit Ausnahme von *UGT1A4* (1,1-fach) und *UGT1A7* (1,8-fach), ein signifikant verringertes mRNA-Expressionslevel für *UGT1A1*, *UGT1A3* und *UGT1A6* (0,5-0,6-fach) gemessen. Darüber hinaus wurde jedoch eine deutliche Heraufregulation für *UGT1A1* (1,3- bis 8,5-fach), *UGT1A3* (1,6- bis 5,1-fach), *UGT1A4* (5,2- bis 7,2-fach) sowie *UGT1A6* (PHx24h: 3,8-fach, PHx72h: 1,5-fach, PHx120h: 3,9-fach) detektiert.

Ein signifikante Verringerung der *UGT1A*-Expression im Kolon *tgUGT1A-SNP*-Mäuse konnte für *UGT1A6* (PHx24h: 0,7-fach) und *UGT1A7* (PHx24h: 0,8-fach, PHx120h: 0,7-fach) gezeigt werden.

3.5.5 Hepatische Cytokin-Expression während der Leberregeneration nach PHx

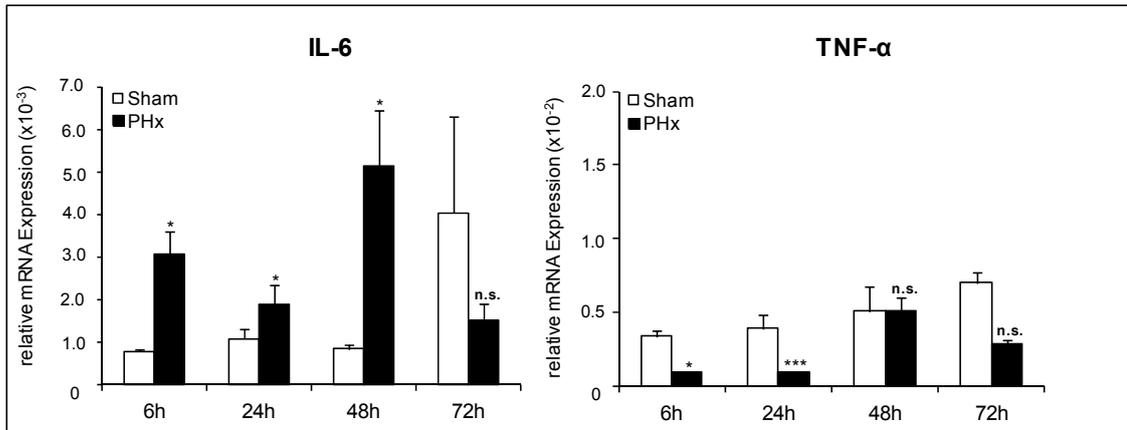


Abb. 69: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx6h-72h). WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ***: $p > 0,001$.

Abb. 69 zeigt die mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx6h-72h).

Während sechs, 24 und 72 Stunden nach Hepatektomie eine signifikante Verringerung der TNF- α -Expression (0,3-, 0,2-, 0,4-fach) gemessen wurde, konnte für IL-6 eine deutliche Heraufregulation sechs bis 48 Stunden nach partieller Hepatektomie (4,0-, 1,7-, 6,2-fach) beobachtet werden. Darüber hinaus wurde ein signifikant verringertes IL-6-Expressionslevel nach 72 Stunden detektiert (0,4-fach).

Neben einer Induktion der IL-6-Expression in der Leber konnte auch eine signifikante Heraufregulation der extrahepatischen IL-6-Expression im Jejunum (1,2- bis 53,1-fach) und im Kolon (1,7- bis 6,2-fach) gemessen werden, wobei die stärkste Induktion jeweils nach 48 Stunden auftrat (Daten hier nicht gezeigt).

3.5.6 Hepatische Expression von Transkriptionsfaktoren während der Leberregeneration nach PHx

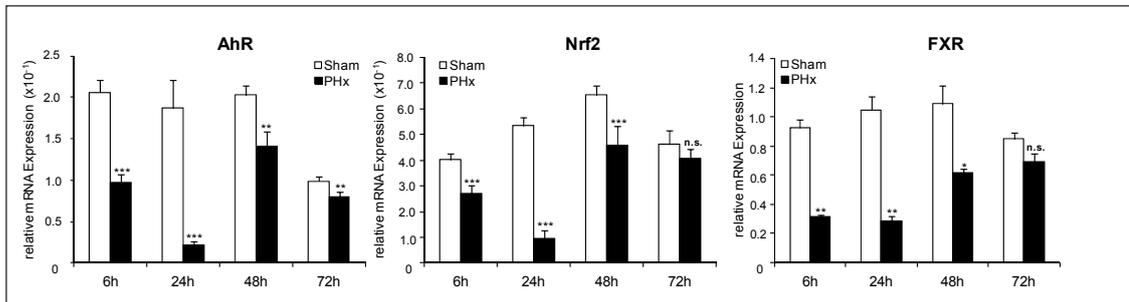


Abb. 70: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx 6h-72h). WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

Abb. 70 zeigt die hepatische Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx6-72h).

Dabei wurde ein signifikant reduziertes Expressionslevel aller Transkriptionsfaktoren detektiert (AhR: 0,5-, 0,1-, 0,7-, 0,8-fach; Nrf2: 0,7-, 0,2-, 0,7-, 0,9-fach; FXR: 0,3-, 0,3-, 0,6-, 0,8-fach), wobei dieses vor allem in der frühen postoperativen Phase deutlich geringer war. 72 Stunden nach Hepatektomie befand sich die Expression der Transkriptionsfaktoren wieder nahezu auf Normallevel.

3.5.7 Extrahepatische Expression von Transkriptionsfaktoren während der Leberregeneration nach PHx

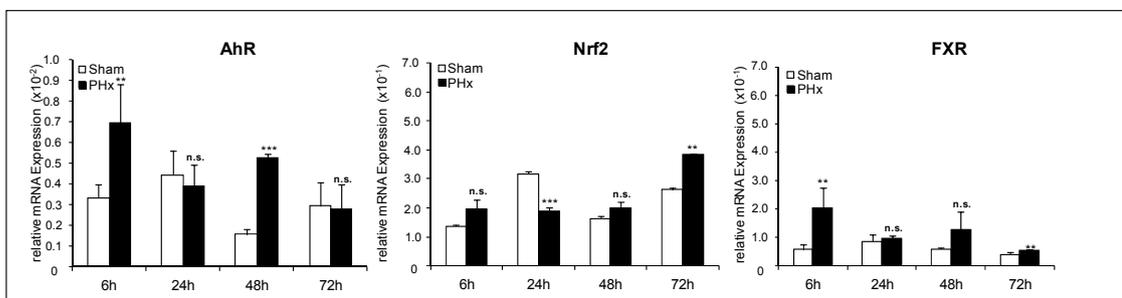


Abb. 71: Extrahepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR im Jejunum *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 6h-72h). WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

Im Jejunum *tgUGT1A-WT*-Mäuse wurde eine deutliche Heraufregulation der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR sechs Stunden (AhR: 2,1-fach, Nrf2: 1,4-fach, FXR: 3,6-fach), 48 Stunden (AhR: 3,3-fach, Nrf2: 1,2-fach, FXR: 2,2-fach), sowie 72 Stunden nach partieller Hepatektomie (Nrf2: 1,5-fach, FXR: 1,4-fach) detektiert. Des Weiteren konnte ein signifikant verringertes Nrf2-Expressionslevel 24 Stunden nach Hepatektomie beobachtet werden (Abb. 71).

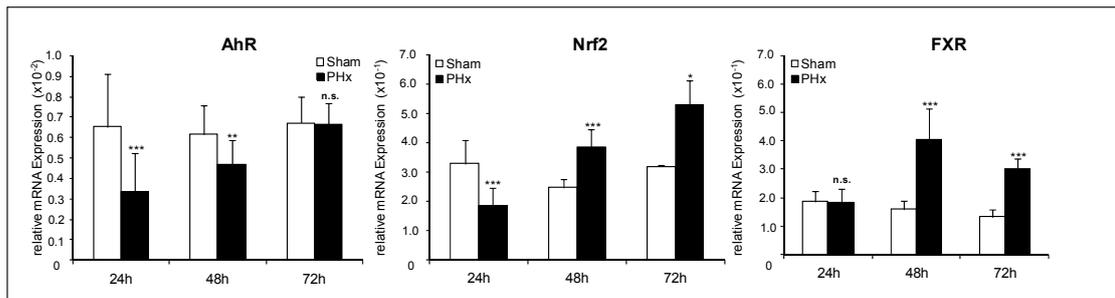


Abb. 72: Extrahepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR im Kolon *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 24h-72h). WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$.

In Abb. 72 ist die extrahepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR im Kolon *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx24h-72h) dargestellt. Neben einem signifikant erniedrigten AhR- und Nrf2-Expressionslevel in der frühen postoperativen Phase (AhR: 0,5-, 0,8-fach; Nrf2: 0,6-fach) konnte eine deutliche Heraufregulation der Nrf2- bzw. FXR-mRNA-Expression nach 48 bzw. 72 Stunden gemessen werden (Nrf2: 1,6-, 1,7-fach; FXR: 2,5-, 2,3-fach).

3.6 GW4064-Behandlung humanisierter *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse während der Leberregeneration (PHx 72h)

Bei vier männlichen transgenen *UGT1A-WT*- bzw. *UGT1A-SNP*-Mäusen wurde unter Isofluran-Anästhesie eine partielle Hepatektomie (PHx) durchgeführt.

Innerhalb des postoperativen Beobachtungszeitraums (72 Stunden nach PHx) wurden diese Tiere ab 24 Stunden nach PHx einmal täglich zwei Tage lang mit dem FXR-Agonisten GW4064 (30 mg/kg/Tag, Vehikel 10% DMSO / 90% Corn Oil) i.p. injiziert. Als Kontrolle dienten jeweils zwei transgene *UGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse, die ab 24 Stunden nach PHx zwei Tage lang mit 10% DMSO / 90% Corn Oil i.p. injiziert wurden.

3.6.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

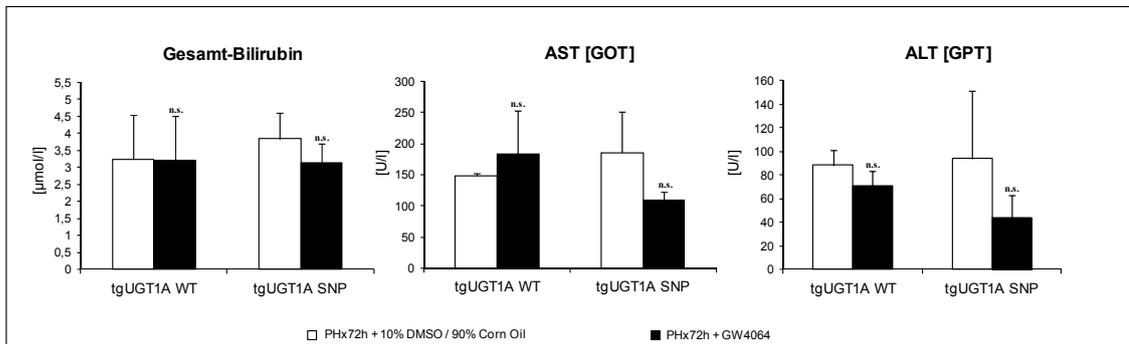


Abb. 73: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 72h) und GW4064-Behandlung. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant.

Die intraperitoneale Injektion *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse mit GW4064 nach partieller Hepatektomie (PHx72h) führte zu keiner signifikanten Veränderung des Bilirubinlevels (WT: 1,0-fach, SNP: 0,8-fach) bzw. der Transaminaseaktivitäten (WT: AST 1,2-fach, ALT 0,8-fach; SNP: AST 0,6-fach, ALT 0,5-fach) gegenüber den Kontrolltieren, welche nach partieller Hepatektomie (PHx72h) mit 10% DMSO / 90% Corn Oil behandelt wurden (Abb. 73).

3.6.2 Histologie der Leber nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

Im Anschluss an die GW4064-Behandlung nach partieller Hepatektomie (PHx 72h) konnte histologisch eine erhöhte Akkumulation von Lipiden in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen festgestellt werden (Vgl. Abb. 75 und 77 A+B). Die immunhistochemische Untersuchung des proliferationsassoziierten Ki-67-Proteins ergab zudem eine erhöhte Anzahl proliferierender Hepatozyten bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen, während *tgUGT1A-SNP*-Mäuse keine Veränderung der hepatozellulären Proliferation aufwiesen (Abb. 74, Abb. 76 und 78 A+B).

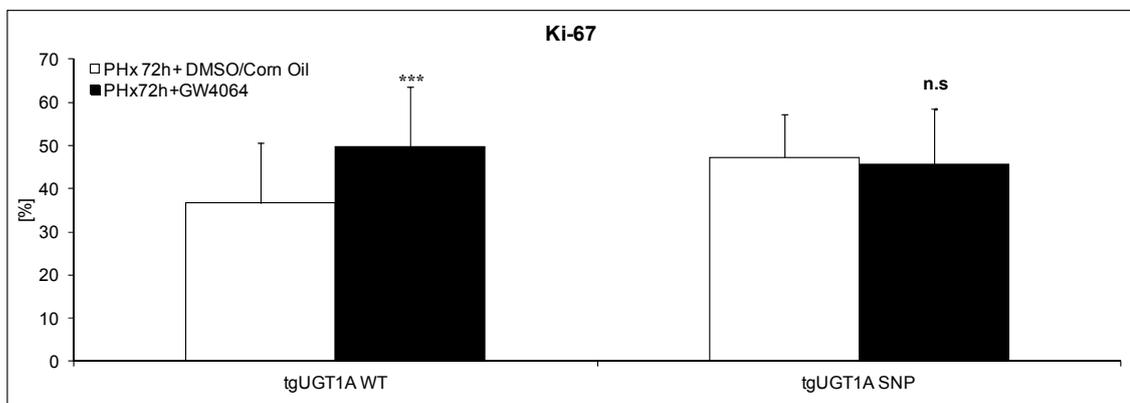


Abb. 74: Prozentualer Anteil Ki-67-positiver Nuclei in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 72h) und GW4064-Behandlung. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, ***: $p > 0,001$, n.s.: nicht signifikant.

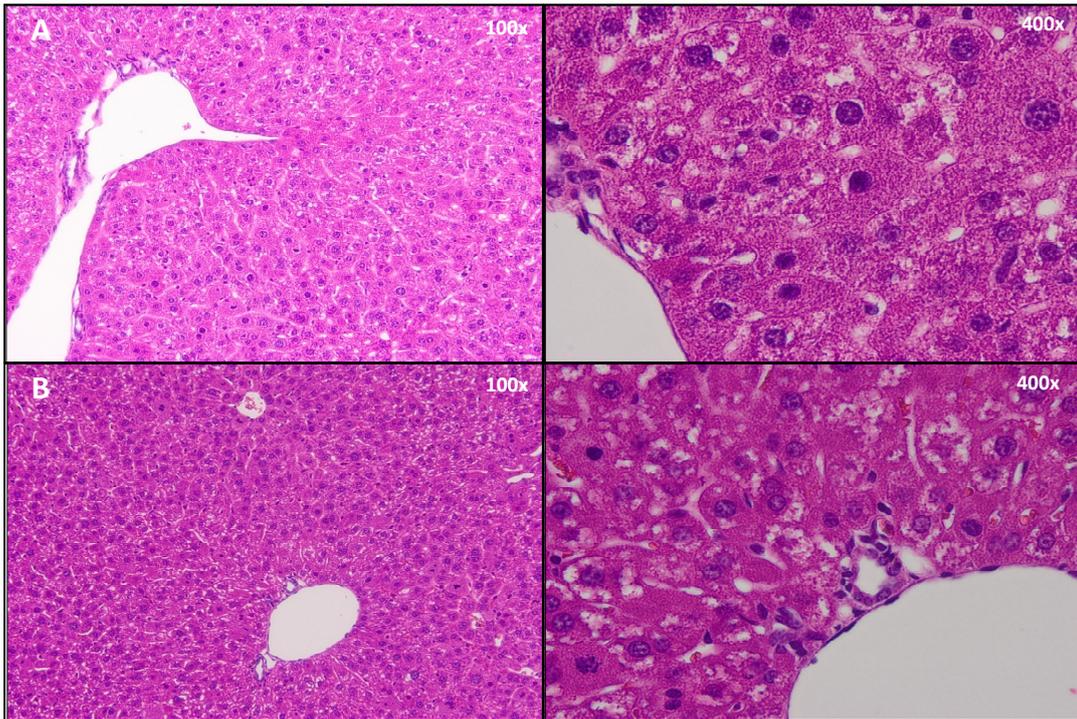


Abb. 75 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. GW4064-Behandlung (B).

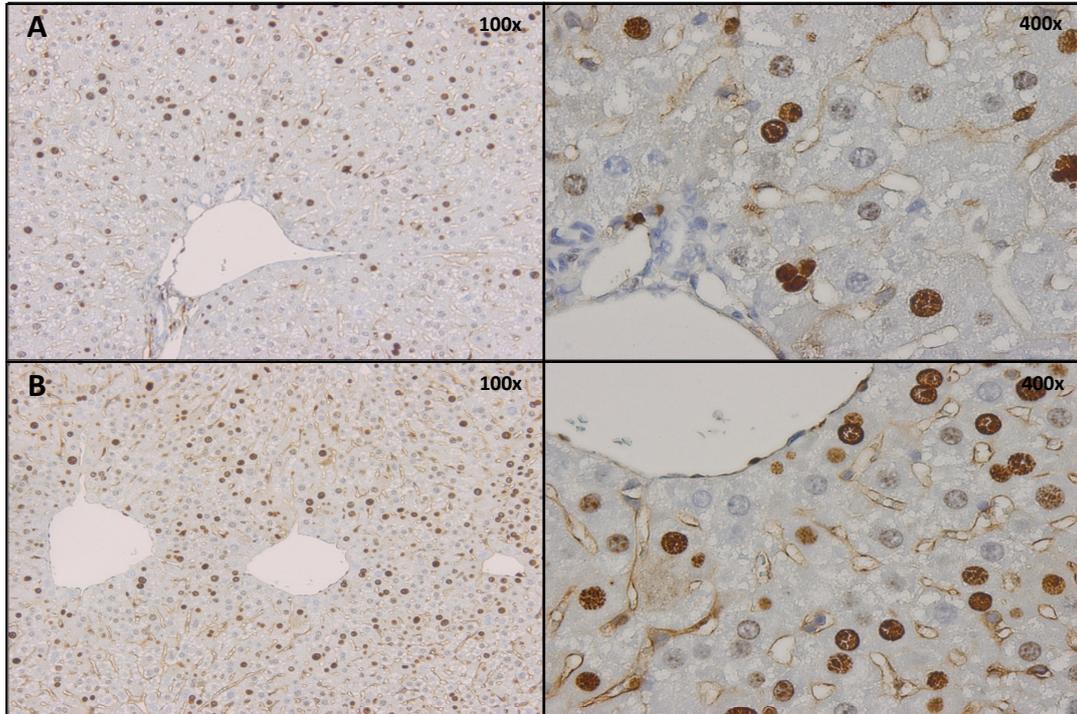


Abb. 76 A+B: Ki-67-Immunhistochemie), *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. GW4064-Behandlung (B).

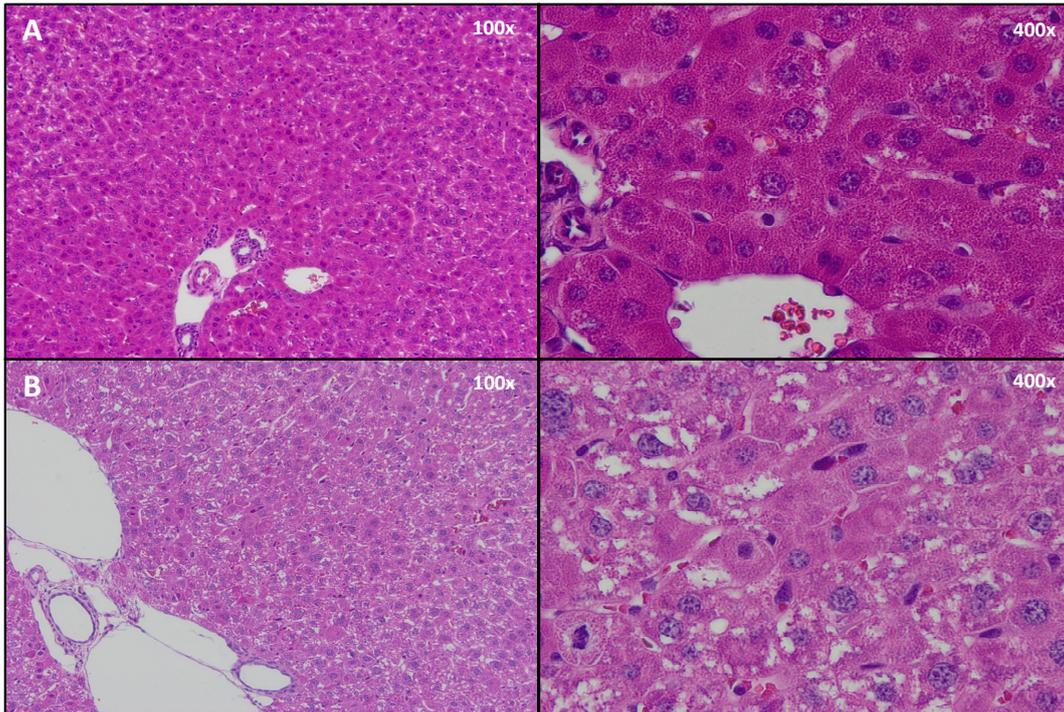


Abb. 77 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. GW4064-Behandlung (B).

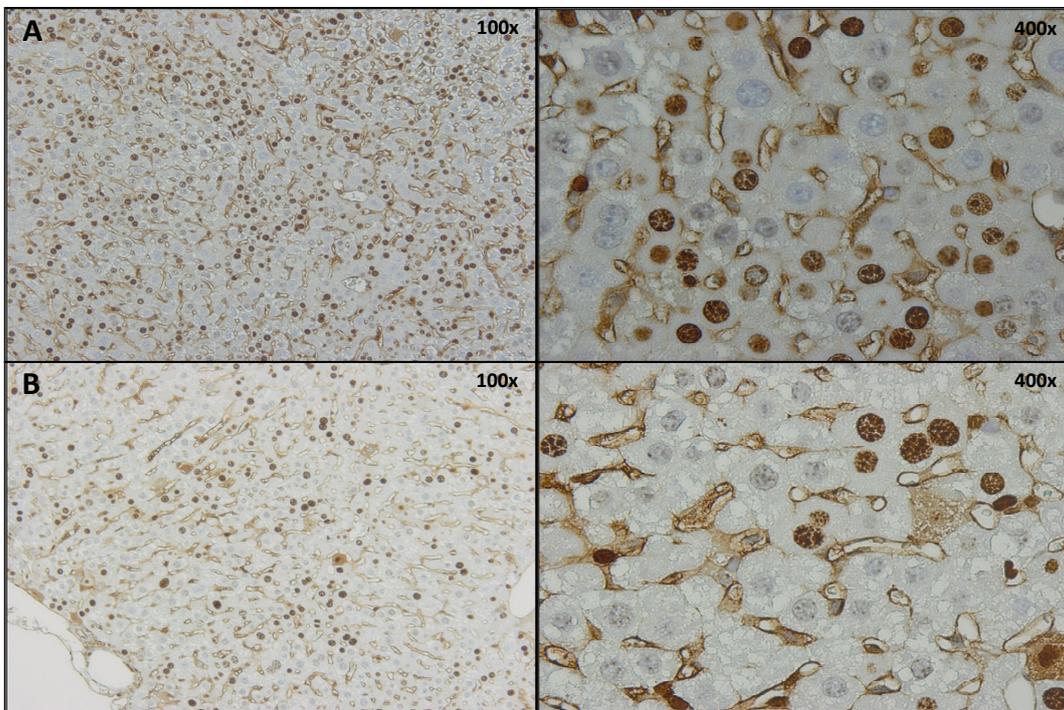


Abb. 78 A+B: Ki-67-Immunohistochemie), *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. GW4064-Behandlung (B).

3.6.3 Hepatische *UGT1A*-Expression nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

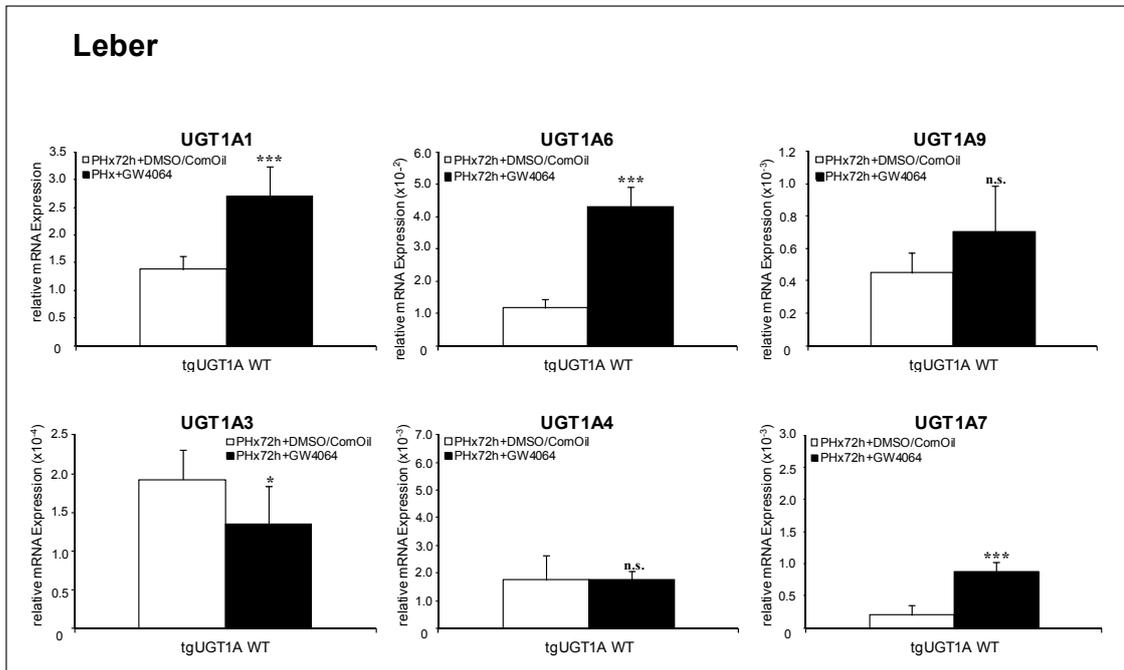


Abb. 79: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration. WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ***: $p > 0,001$.

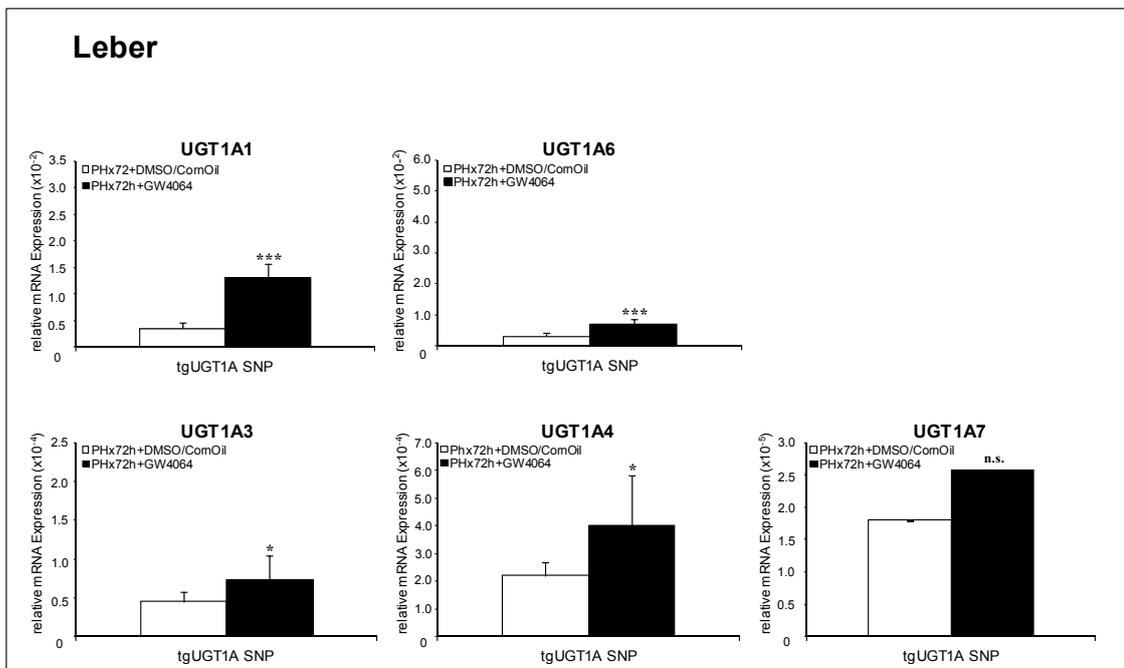


Abb. 80: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration. SNP: Mutante n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ***: $p > 0,001$.

In Abb. 79 und Abb. 80 ist die hepatische *UGT1A*-Expression *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx72h) und zusätzlicher Behandlung mit GW4064 dargestellt. In der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse wurden, mit Ausnahme von *UGT1A3* (0,7-fach) und *UGT1A4* (1,0-fach), alle *UGT1A*-Gene signifikant induziert (1,6- bis 4,3-fach). Im Gegensatz dazu konnte bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen (Abb. 80) eine deutliche Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene (1,4- bis 3,7-fach), mit Ausnahme von *UGT1A9* (nicht detektierbar), beobachtet werden.

3.6.4 Extrahepatische *UGT1A*-Expression nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

Während in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx72h) und zusätzlicher GW4064-Behandlung ein signifikant verringertes Expressionslevel für alle *UGT1A*-Gene (0,1- bis 0,4-fach) gemessen wurde, konnte bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen neben einer deutlich geringeren *UGT1A1*-Expression (0,6-fach), eine Heraufregulation für *UGT1A3* und *UGT1A4* (1,3- bis 1,6-fach) detektiert werden (Abb.82).

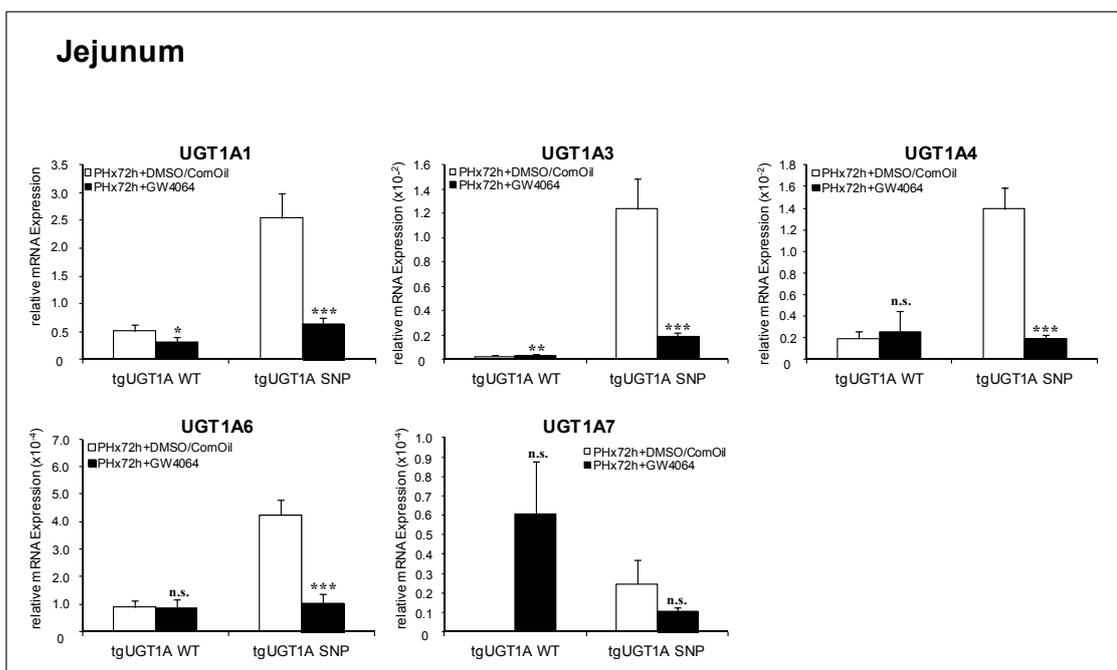


Abb. 81: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, ***: $p > 0,001$.

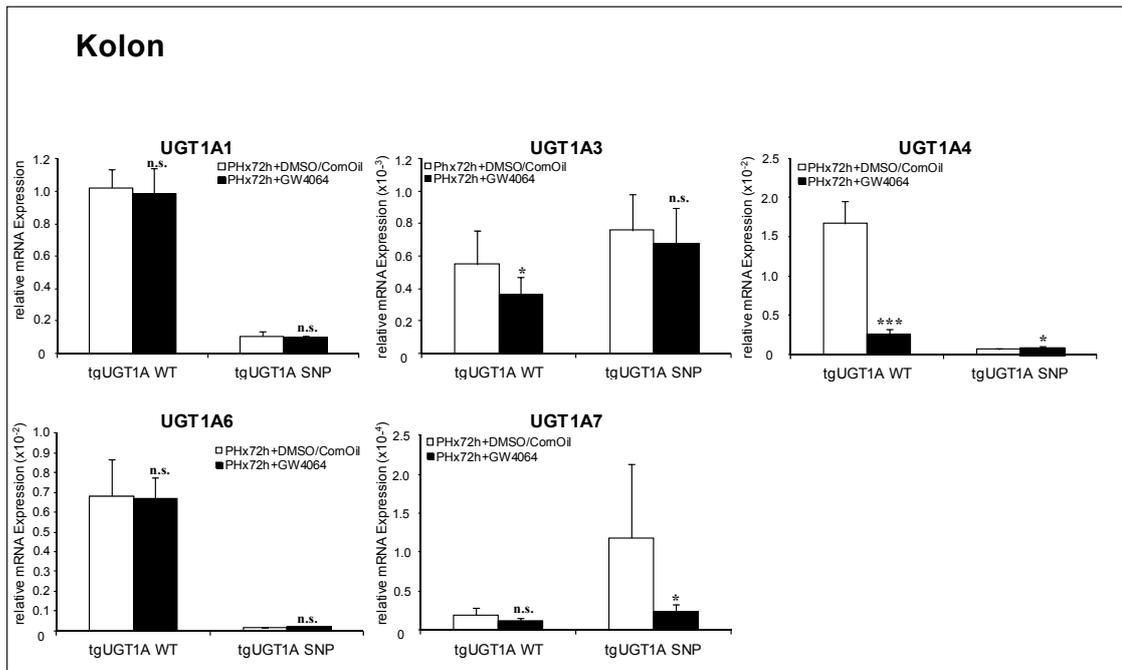


Abb. 82: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Kolon von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, ***: $p > 0,001$.

Abb. 82 zeigt die *UGT1A*-Expression im Kolon *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie und zusätzlicher Behandlung mit GW4064.

Diese führte bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen zu einem signifikant verringertem Expressionslevel für *UGT1A3* (0,7-fach), *UGT1A4* (0,2-fach) und *UGT1A7* (0,6-fach), während eine stabile Expression für *UGT1A1* und *UGT1A6* (1,0-fach) detektiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde im Kolon *tgUGT1A-SNP*-Mäuse neben einem weitgehend stabilen Expressionslevel der *UGT1A1*- und *UGT1A3*-Gene (0,9-fach) eine deutlich verringerte *UGT1A7*-Expression (0,2-fach) sowie eine Heraufregulation für *UGT1A4* (1,4-fach) und *UGT1A6* (1,2-fach) verzeichnet.

3.7 TCDD-Behandlung humanisierter *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse während der Leberregeneration (PHx 72h)

Bei vier männlichen transgenen *UGT1A-WT*- bzw. *UGT1A-SNP*-Mäusen wurde unter Isofluran-Anästhesie eine partielle Hepatektomie (PHx) durchgeführt.

Innerhalb des postoperativen Beobachtungszeitraums (72 Stunden nach PHx) wurden diese Tiere ab 24 Stunden nach PHx einmal täglich zwei Tage lang mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) (10 µg/kg/Tag, Vehikel 10% DMSO / 90% Corn Oil) i.p. injiziert. Als Kontrolle dienten jeweils zwei transgene *UGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse, die ab 24 Stunden nach PHx zwei Tage lang mit 10% DMSO / 90% Corn Oil i.p. injiziert wurden.

3.7.1 Serumtransaminaseaktivitäten und Bilirubinlevel nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

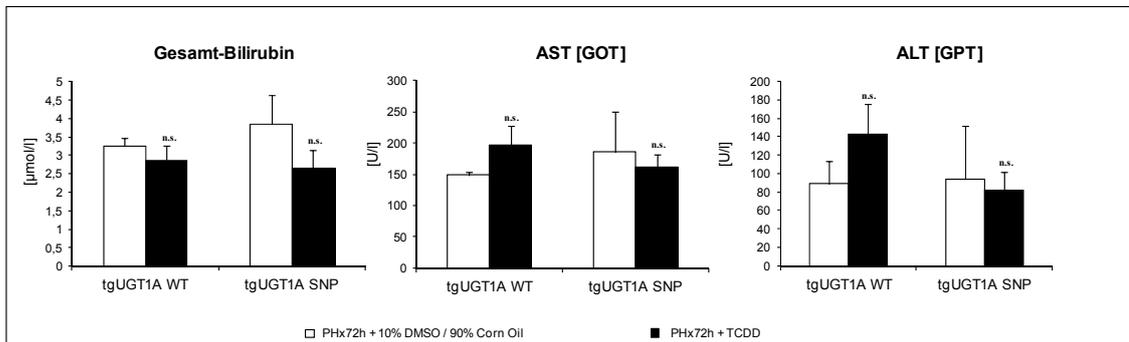


Abb. 83: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 72h) und TCDD-Behandlung. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant.

Die TCDD-Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx72h) führte zu keiner signifikanten Veränderung des Bilirubinlevels (WT: 0,9-fach, SNP: 0,7-fach) bzw. der Transaminaseaktivitäten (WT: AST 1,3-fach, ALT 1,6-fach; SNP: AST 0,9-fach, ALT 0,9-fach) gegenüber den Kontrolltieren, welche nach partieller Hepatektomie (PHx72h) mit 10% DMSO / 90% Corn Oil behandelt wurden (Abb. 83).

3.7.2 Histologie der Leber nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

Sowohl *tgUGT1A-WT*- als auch *tgUGT1A-SNP*-Mäuse zeigten nach TCDD-Behandlung im Anschluss an die partielle Hepatektomie (PHx72h) eine verstärkte Vakuolenbildung und Fetteinlagerung in den Hepatozyten, wobei in der Leberhistologie (HE) *tgUGT1A-SNP*-Mäuse zusätzlich nekrotische Bereiche zu erkennen waren (Vgl. Abb. 85 und 87 A+B).

Mittels Ki-67-Immunhistochemie wurde darüber hinaus bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen eine Verringerung der Anzahl mitotisch aktiver Hepatozyten und somit eine Inhibition der Proliferation nachgewiesen, während bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen eine erhöhte Proliferation beobachtet werden konnte (Abb. 84, Abb. 86 und 88 A+B).

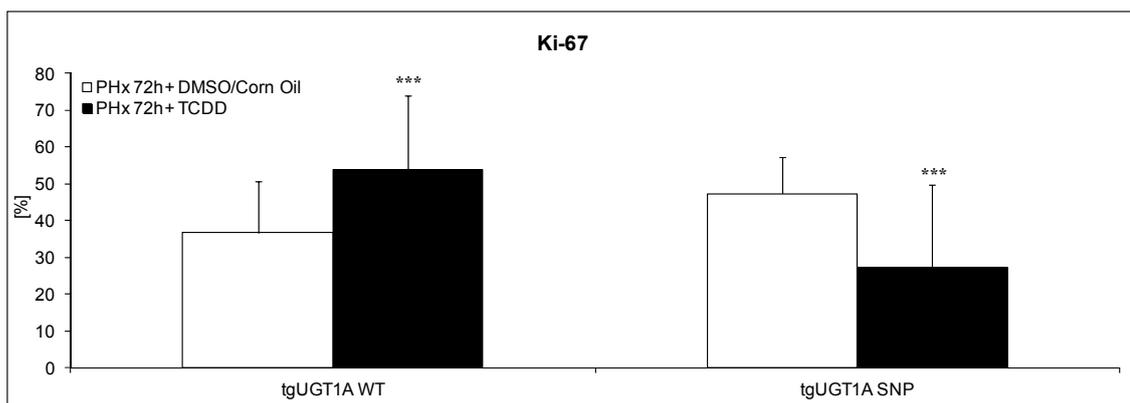


Abb. 84: Prozentualer Anteil Ki-67-positiver Nuclei in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 72h) und TCDD-Behandlung. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, ***: $p > 0,001$.

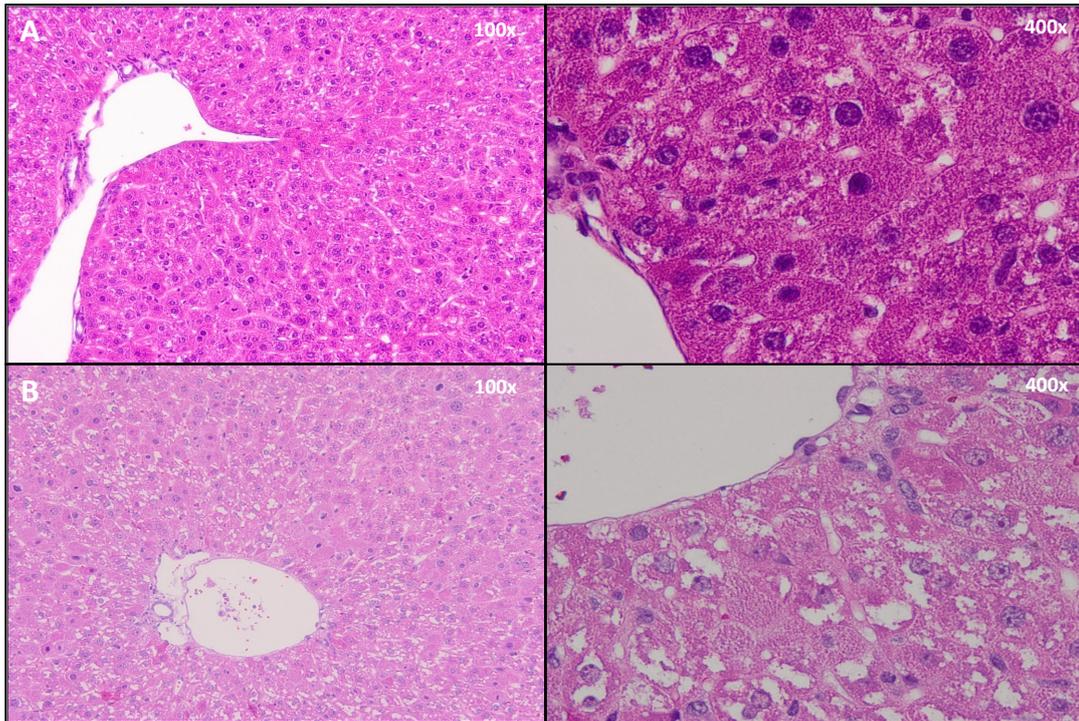


Abb. 85 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. TCDD-Behandlung (B).

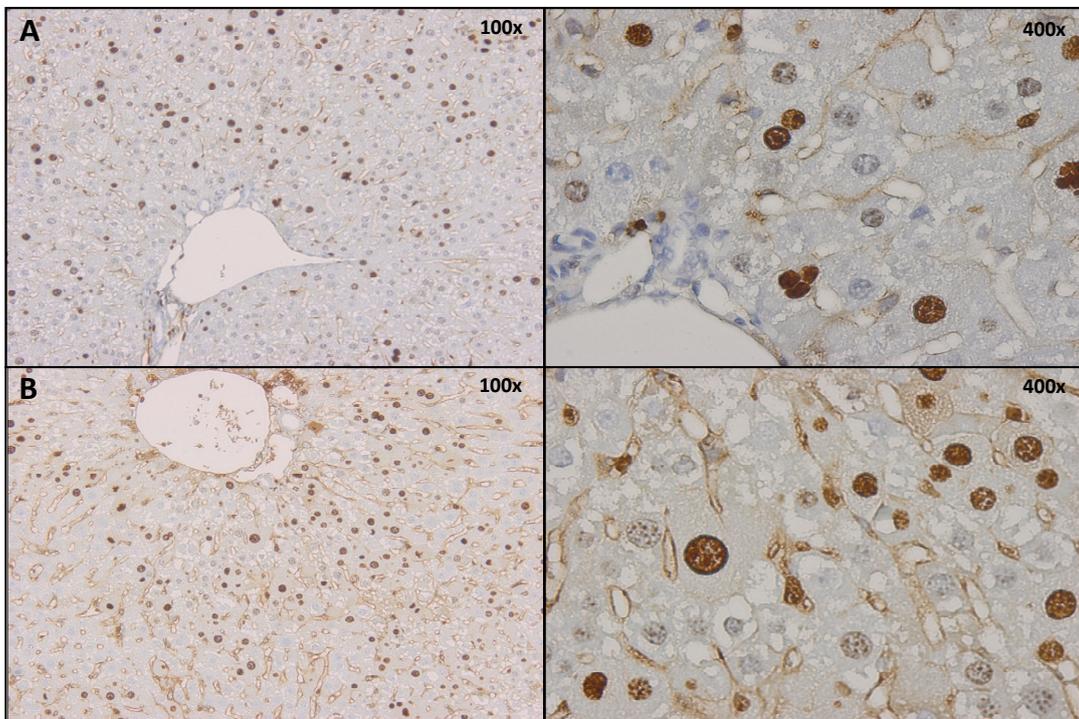


Abb. 86 A+B: Ki-67-Immunhistochemie, *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. TCDD-Behandlung (B).

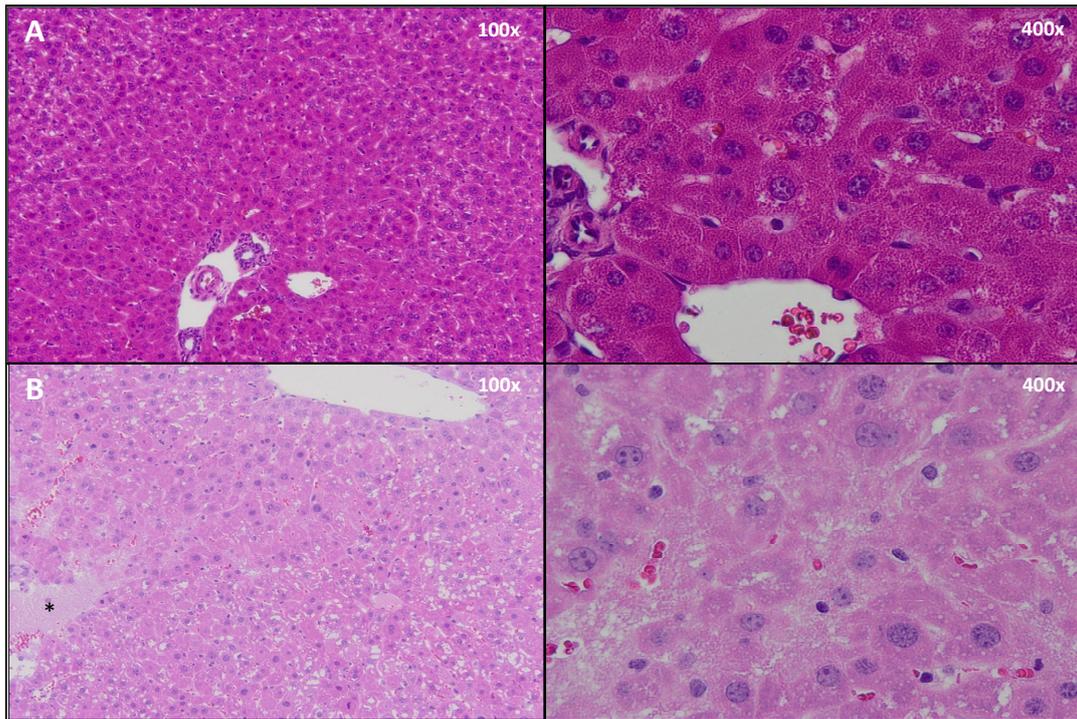


Abb. 87 A+B: Leberhistologie (HE), *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. TCDD-Behandlung (B).

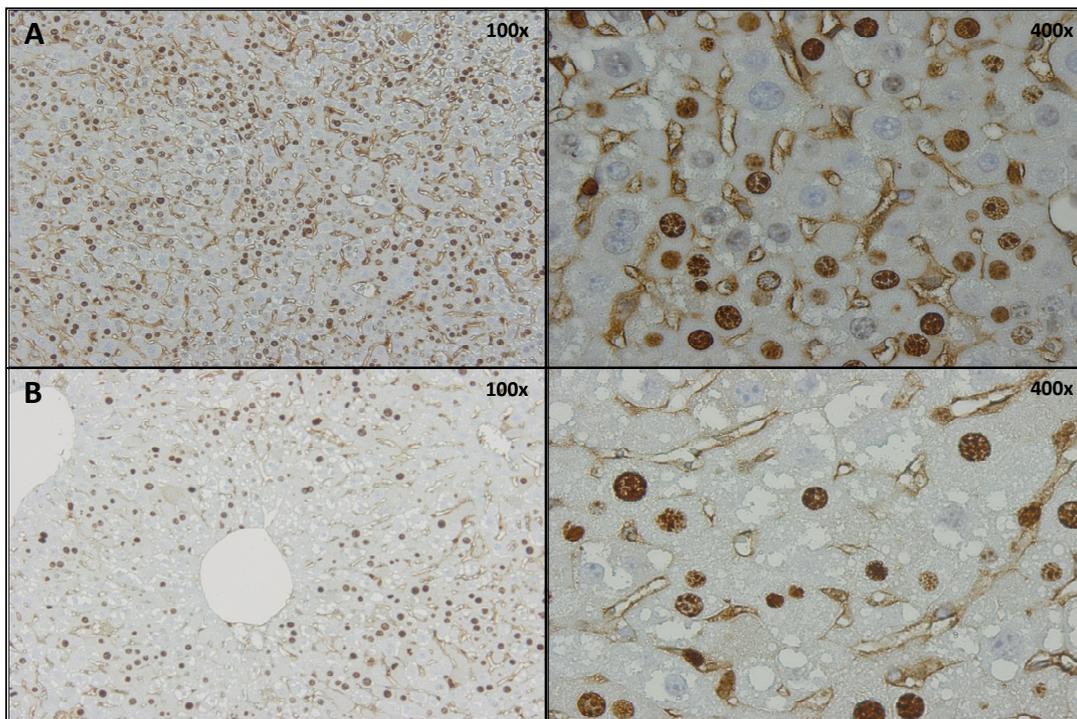


Abb. 88 A+B: Ki-67-Immunhistochemie, *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Hepatektomie (PHx 72h) und DMSO/Corn Oil- (A) bzw. TCDD-Behandlung (B).

3.7.3 Hepatische *UGT1A*-Expression nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

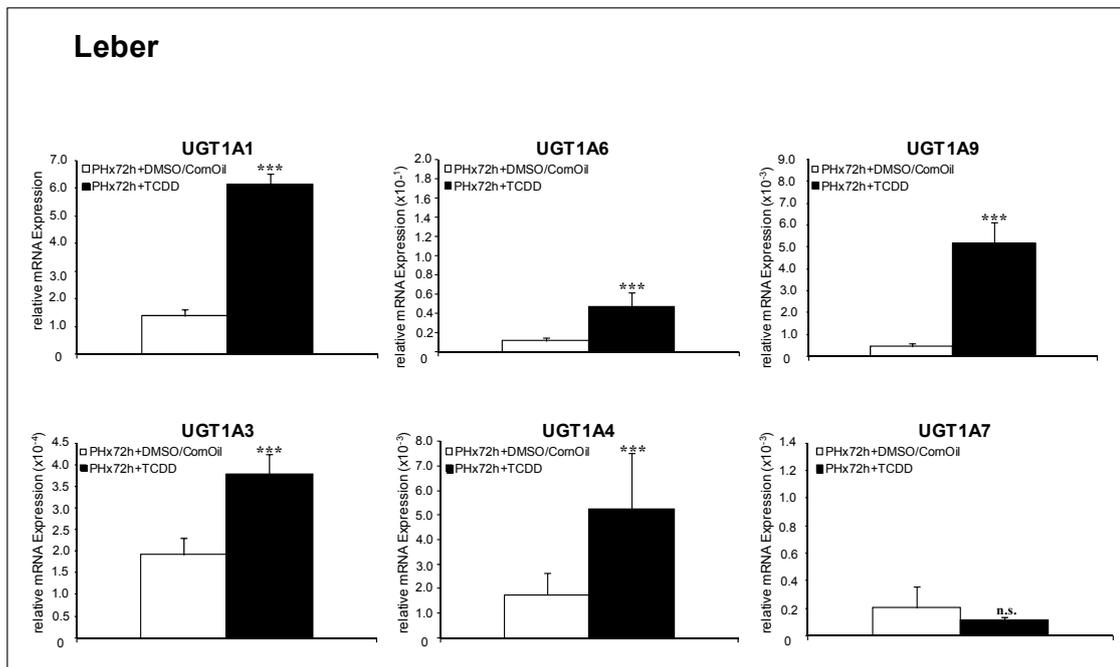


Abb. 89: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration. WT: Wildtyp, n.s.: nicht signifikant, ***: $p > 0,001$.

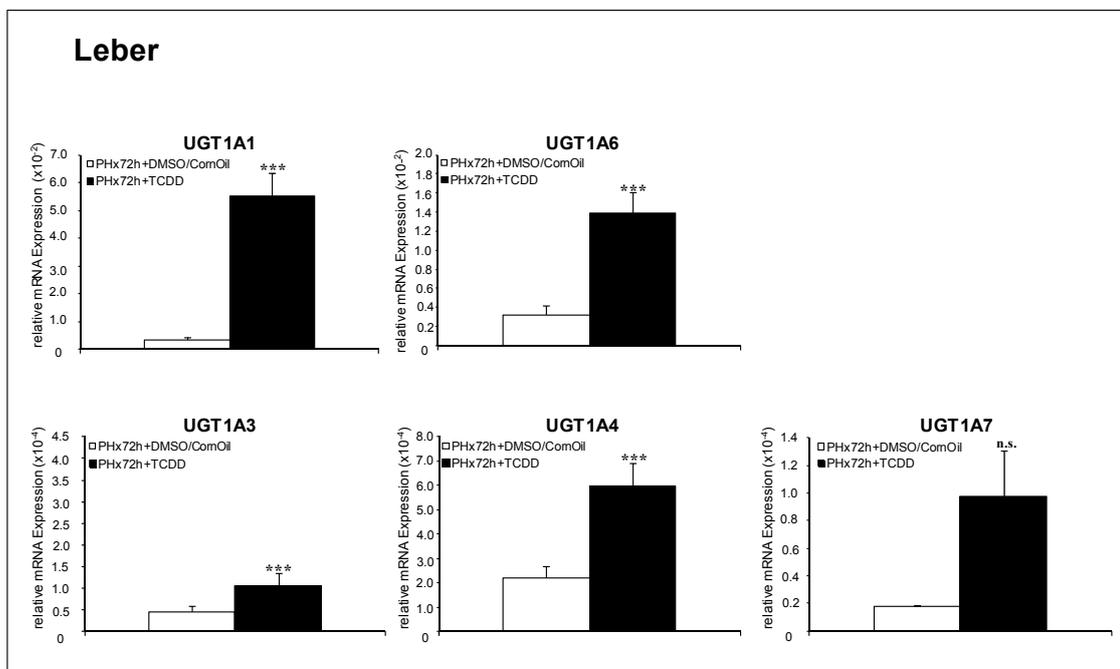


Abb. 90: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber von *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration. SNP: Mutante n.s.: nicht signifikant, ***: $p > 0,001$.

Die TCDD-Behandlung während der Leberregeneration führte sowohl in *tgUGT1A-WT*- als auch in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen zu einer signifikanten Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene (WT: 2,0- bis 11,5-fach, SNP: 2,3-bis 15,8-fach), mit Ausnahme von *UGT1A7* (0,6-fach) bei *WT*-Mäusen und *UGT1A9* (nicht detektierbar) bei *SNP*-Mäusen. Die stärkste Induktion wurde dabei für *UGT1A9* (11,5-fach) bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen und *UGT1A1* (15,8-fach) bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen detektiert (Abb. 89 + 90).

3.7.4 Extrahepatische *UGT1A*-Expression nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration (PHx 72h)

Nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration konnte im Jejunum *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse neben einer deutlichen Verringerung des Expressionslevels für *UGT1A1* (WT: 0,7-fach, SNP: 0,3-fach), *UGT1A3* (SNP: 0,1-fach), *UGT1A4* (WT: 0,8-fach, SNP: 0,1-fach) und *UGT1A7* (SNP: 0,6-fach) eine Heraufregulation der mRNA-Expression für *UGT1A3* (WT: 1,3-fach) und *UGT1A6* (WT: 1,2-fach, SNP: 1,3-fach) beobachtet werden (Abb. 91).

Im Kolon *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse konnte nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration neben einem deutlich verringerten Expressionslevel für *UGT1A4* (WT: 0,5-fach, SNP: 0,8-fach) und *UGT1A7* (WT: 0,5-fach, SNP: 0,2-fach) eine signifikante Induktion der *UGT1A1*- (SNP: 2,4-fach), *UGT1A3*- (WT: 1,9-fach, SNP: 1,8-fach) und *UGT1A6*-mRNA-Expression (WT: 6,3-fach, SNP: 5,1-fach) detektiert werden (Abb. 92).

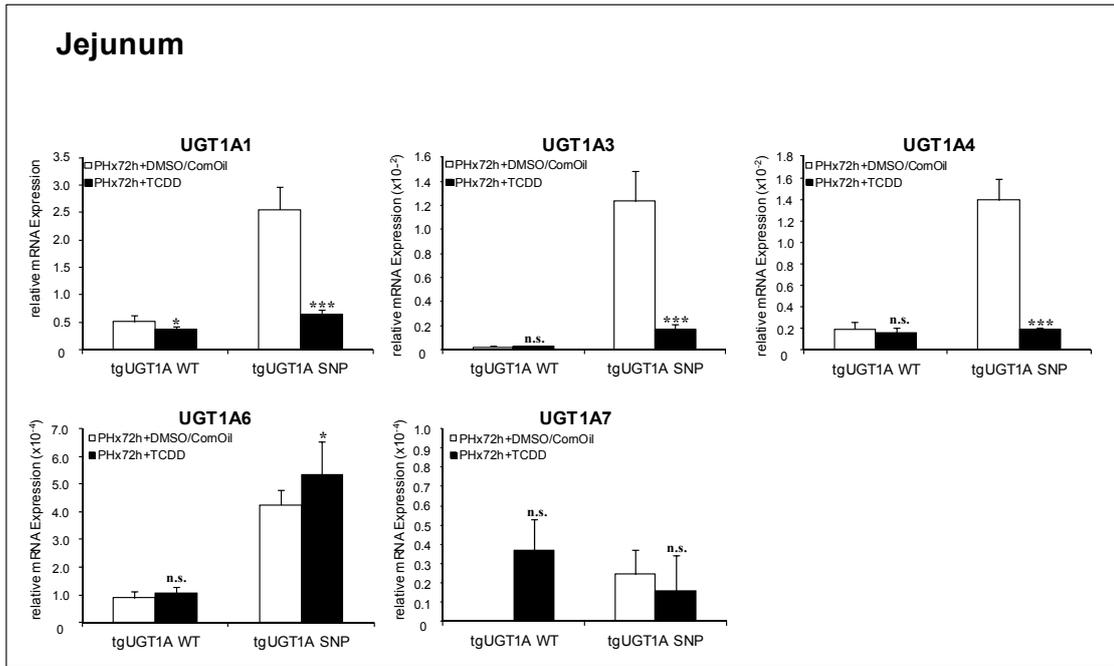


Abb. 91: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum von *tgUGT1A*-WT- und *tgUGT1A*-SNP-Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, *: $p > 0,001$.**

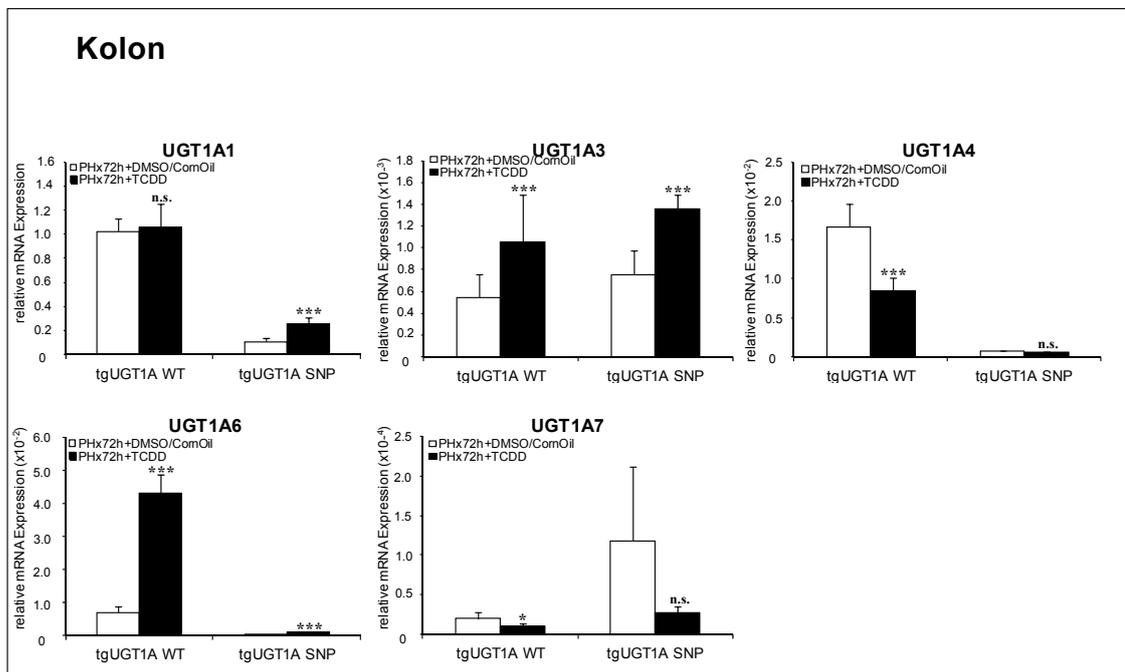


Abb. 92: Regulation der *UGT1A*-mRNA-Expression im Kolon von *tgUGT1A*-WT- und *tgUGT1A*-SNP-Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration. WT: Wildtyp, SNP: Mutante, n.s.: nicht signifikant, * : $p > 0,05$, *: $p > 0,001$.**

4. Diskussion

4.1 Differentielle und gewebespezifische Regulation der hepatischen und extrahepatischen intestinalen *UGT1A*-Genexpression im humanisierten *tgUGT1A*-Mausmodell durch den FXR-Agonisten GW4064

Der Gallensäure- oder auch Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) ist ein Mitglied der Familie der nukleären Hormonrezeptoren, dessen hepatische Aktivierung u.a. zur Hemmung von Gallensäure-Import und -Biosynthese sowie zur Induktion der Transkription von Transporter-Genen führt, welche die Gallensäure-Clearance vermitteln [177]. GW4064, ein synthetischer FXR-Agonist, wurde bereits in Tiermodellen cholestatischer Lebererkrankungen und einem Mausmodell der Gallensäuremalabsorption verwendet und zeigte dort sowohl hepatoprotektive als auch positive gastrointestinale Effekte [177, 178]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt der GW4064-vermittelten FXR-Aktivierung auf die Expression humaner UDP-Glukuronosyltransferasen zu untersuchen. Diese werden u.a. in der Leber und im Gastrointestinaltrakt exprimiert und sind dort von zentraler Bedeutung für die Detoxifikation xeno- und endobiotischer Substanzen, wodurch sie deren renale und biliäre Eliminierung ermöglichen.

Für die Detoxifikation von Gallensäuren durch Glukuronidierung spielt vor allem *UGT1A3* eine wichtige Rolle. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde *in vitro* bereits eine GW4064-vermittelte Heraufregulation des *UGT1A3*-Gens gezeigt. Des Weiteren konnte ein FXR Response Element (FXRE) im Promotor des *UGT1A3*-Gens identifiziert werden, wobei dessen Funktionalität durch die Präsenz eines bei 10 % der kaukasischen Bevölkerung vorkommenden SNPs beeinflusst wird [53, Abb. 8]. Bislang fehlte jedoch der Nachweis, dass *UGT1A3* auch *in vivo* durch GW4064 induziert werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun erstmals eine *in vivo* Regulation humaner *UGT1A*-Gene im transgenen *UGT1A*-Mausmodell durch GW4064.

Um mögliche hepatotoxische Effekte des synthetischen FXR-Agonisten GW4064 auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit nach viertägiger Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse zunächst eine Serumanalyse der Transaminase-Aktivitäten (AST, ALT) (Abb. 19) sowie eine histologische Analyse der Leber (Abb. 20) durchgeführt. Obwohl histologisch keine Anzeichen für einen Leberschaden erkennbar waren und die Serumtransaminasen in GW4064-behandelten Versuchstieren

gegenüber den Kontrollen (mit DMSO / Corn Oil behandelt) nicht signifikant erhöht waren, wurde bei *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach i.p. Injektion des FXR-Liganden eine Induktion des hepatischen mRNA-Expressionslevels der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und TNF- α gemessen (Abb. 25). Diese war statistisch zwar nicht signifikant, zeigt jedoch eine Tendenz für eine entzündliche Reaktion infolge der GW4064-Behandlung.

Durch Analyse der mRNA-Expression detoxifizierender UDP-Glukuronosyltransferasen konnte eine signifikante Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse gezeigt werden, denen intraperitoneal vier Tage lang GW4064 injiziert wurde (Abb. 21 u. 22). Eine Ausnahme bildete dabei *UGT1A3* in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. Erstaunlicherweise wurden neben der Expression des FXR-Zielgens *UGT1A3* (bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen) auch andere *UGT1A*-Gene heraufreguliert, für die bereits eine Regulation durch die Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 gezeigt werden konnte [53, 108].

Tatsächlich führte die GW4064-Behandlung neben einer erhöhten Genexpression des Farnesoid-X-Rezeptors in der Leber von *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen zu einer Induktion der hepatischen AhR- und Nrf2-Expression (Abb. 26), die möglicherweise eine Heraufregulation der hepatischen *UGT1A*-Gene bewirkt, die nicht als direkte FXR-Zielgene bekannt sind. Diese Daten sprechen daher erneut für eine Verbindung zwischen dem Metabolismus von Gallensäuren (FXR) und Xenobiotika-vermittelten (XRE, AhR) bzw. antioxidativen Abwehrmechanismen (ARE, Nrf2) [51, 110, Abb. 8]. Infolge einer Xenobiotika-vermittelten Aktivierung des *UGT1A3*-Gens oder durch oxidativen Stress könnte es so zu einer erhöhten Glukuronidierung von Gallensäuren kommen, die wiederum die negative Feedback-Regulation der Gallensäurebiosynthese beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass im Rahmen der GW4064-Behandlung von *tgUGT1A*-Mäusen auch andere, nicht FXR-spezifische, Effekte ausgelöst werden, die eventuell im Zusammenhang mit der diskreten Inflammation stehen.

Da bekannt ist, dass die Regulation des Gallensäure-Metabolismus nicht nur über die Aktivierung negativer Feedback-Mechanismen in der Leber (FXR \rightarrow SHP \rightarrow CYP7A1), sondern auch durch Induktion des intestinalen FXR-FGF15/19-Signalweges erfolgt, wurde nach Behandlung *tgUGT1A*-Mäuse mit dem FXR-Agonisten GW4064 auch die extrahepatische *UGT1A*-Expression im Jejunum und Kolon untersucht [63, 179]. Während im Kolon *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach GW4064-Behandlung eine

Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene nachgewiesen werden konnte, zeigten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse neben einer verringerten *UGT1A1*- und *UGT1A7*-Expression lediglich eine Induktion des *UGT1A3*- und *UGT1A4*-Gens (Abb. 24). Letztere wiesen auch im Jejunum eine deutliche Verringerung der *UGT*-Expression, mit Ausnahme von *UGT1A7*, auf. Im Jejunum *tgUGT1A-WT*-Mäuse wurde dagegen bis auf *UGT1A1* und *UGT1A3* keine signifikante Veränderung extrahepatischer *UGT1A*-Gene detektiert (Abb. 23). Insgesamt konnten bezüglich der Regulation des FXR-Zielgens *UGT1A3* sowohl in der Leber (WT: 4,9-fach, SNP: 1,2-fach) als auch in extrahepatischen Geweben, im Jejunum (WT: 0,7-fach, SNP: 0,1-fach) und im Kolon (WT: 5,2-fach, SNP: 2,2-fach), deutliche Unterschiede zwischen *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen festgestellt werden, wobei die Behandlung mit GW4064 in der Leber und im Kolon in einem signifikant unterschiedlichen Expressionslevel resultierte.

Diese Daten korrelieren mit dem bereits *in vitro* beobachteten Verlust der signifikanten Induzierbarkeit einer mutagenisierten *UGT1A3*-Genvariante (-66C/-204G) durch die Gallensäure CDCA (natürlicher FXR-Ligand) im Vergleich zur *UGT1A3*-Genvariante (-66T/-204A) [53]. Als Teil eines Haplotypen, der sich aus zehn häufig in der Bevölkerung vorkommenden Polymorphismen zusammensetzt, ist die *UGT1A3*(-66T>C)-Genvariante im humanen *UGT1A*-Lokus der *tgUGT1A-SNP*-Mauslinie enthalten und führt zu einer verringerten basalen *UGT1A3*-Expression im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen. Aufgrund der Polymorphismen, welche *tgUGT1A-SNP*-Mäuse im transgenen *UGT1A*-Lokus aufweisen (Abb. 14), zeigen sie vor allem in der Leber ein im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen wesentlich geringeres *UGT*-Expressionslevel. In diesem Zusammenhang wird die Heraufregulation hepatischer *UGT1A*-Gene durch GW4064 bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen daher wieder relativiert.

Anhand des *tgUGT1A*-Mausmodells konnte der Einfluss von Polymorphismen im humanen *UGT1A*-Lokus auf die Induzierbarkeit hepatisch und extrahepatisch exprimierter *UGT1A*-Gene durch den FXR-Agonisten GW4064 demonstriert werden.

Im Rahmen der Entwicklung therapeutischer Strategien zur Behandlung cholestatischer Lebererkrankungen können diese Ergebnisse u.a. zum besseren Verständnis einer veränderten Pharmakokinetik bei Trägern bestimmter *UGT1A*-Haplotypen beitragen, da diese ein erhöhtes Potential für unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen.

4.2 Differentielle und gewebespezifische Regulation der Glukuronidierung bei obstruktiver Cholestase (BDL) im *htgUGT1A*-Mausmodell und Modulation durch FXR- und AhR-Agonisten

Durch die enterohepatische Zirkulation von Gallensäuren wird die Eliminierung von Cholesterol, Toxinen und metabolischen Nebenprodukten, wie Bilirubin, aus der Leber und die Resorption von Fetten und fettlöslichen Vitaminen aus dem Darm gewährleistet [177]. Infolge einer Beeinträchtigung oder gar vollständigen Unterbrechung des Galleflusses während einer Cholestase akkumulieren Gallensäuren und andere Toxine in der Leber und wirken sich auf die dortigen Zellen toxisch aus.

Um die molekularen Mechanismen cholestatischer Lebererkrankungen besser verstehen zu können, wurden in zahlreichen Studien bereits die am Metabolismus und Transport von Gallensäuren beteiligten Enzyme untersucht [133, 180, 181]. Eine genaue Analyse detoxifizierender Phase-II-Enzyme bei funktionell oder mechanisch bedingten Störungen des Gallenflusses fehlt jedoch bislang. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Auswirkungen einer experimentell durch Gallengangsligatur (BDL) induzierten obstruktiven Cholestase auf die Expression hepatisch und extrahepatisch exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen im humanisierten *tgUGT1A*-Mausmodell. Des Weiteren sollte geklärt werden, wie sich *UGT1A*-Varianten, die als Haplotyp Teil des Transgens der humanisierten *SNP*-Mauslinie sind, auf das klinische Bild der Cholestase auswirken.

Durch Analyse des Serums der Versuchstiere nach BDL konnte dabei zunächst eine signifikante Erhöhung der Cholestase-Parameter (Gesamt-Bilirubin, AST, ALT) bei *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen festgestellt werden, wobei in der Zeitreihe bereits deutliche Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Leberwerterhöhung zwischen den beiden Mauslinien aufgezeigt wurden (Abb. 28). Vor allem in der frühen postoperativen Phase (24 Stunden nach BDL) wiesen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse ein im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen stark erhöhtes Bilirubinlevel sowie einen sprunghaften Anstieg der Transaminaseaktivitäten auf. Basierend auf der Annahme, dass *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse im murinen *Ugt1a*-Lokus keine Unterschiede aufweisen, ist der starke Konzentrationsanstieg des gelben Gallenpigmentes im Serum *tgUGT1A-SNP*-Mäuse 24 Stunden nach Ligatur des Gallenganges daher möglicherweise auf den mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom assoziierten *UGT1A1*28*-Promoterpolymorphismus zurückzuführen, der als

Bestandteil des humanen transgenen *UGT1A-SNP*-Lokus zu einer um 70 % reduzierten Bilirubin-Konjugation führt [123].

Eine Erhöhung des Gesamtbilirubins im Serum nicht-gallengangsligierter *htgUGT1A-SNP*-Mäuse wurde jedoch nicht detektiert (Abb. 28). Daher liegt die Vermutung nahe, dass in Abwesenheit einer Gallenabflussstörung (obstruktive Cholestase) die reduzierte Bilirubin-Konjugation der humanen *UGT1A1*28*-Enzymvariante durch die Aktivität des murinen *Ugt1a1*-Enzyms ausgeglichen werden kann.

Während der obstruktiven Cholestase, in der vorliegenden Arbeit hervorgerufen durch experimentelle Ligatur des Gallenganges, kommt es jedoch neben der Retention des Bilirubins in der Leber und im Blut auch zu einem Rückstau toxischer Gallensäuren und anderer gallepflichtiger Substanzen. Daraus resultiert in der frühen postoperativen Phase nach BDL bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen möglicherweise ein verstärkter Übertritt des Bilirubins in die Blutbahn, welcher zu einem enormen Anstieg der Serumkonzentration des Gallenfarbstoffes sowie zu erheblichen hepatozellulären Schädigungen (Nekrosen) infolge erhöhter Toxizität führt. In Korrelation mit den deutlich erhöhten Transaminaseaktivitäten und dem sprunghaften Anstieg des Gesamtbilirubins konnten diese bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen histologisch bereits 24 Stunden nach Gallengangsligatur nachgewiesen werden. *TgUGT1A-WT*-Mäuse zeigten dagegen erst drei Tage nach BDL vermehrt nekrotische Bereiche (Vgl. Abb. 29-32).

In der manifesten Cholestase konnte zudem sowohl bei *tgUGT1A-WT*- als auch bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Cytokine (IL-6, TNF- α) detektiert werden, wobei *tgUGT1A-SNP*-Mäuse ein deutlich höheres Expressionslevel des Tumornekrosefaktors- α , im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen, aufwiesen (Abb. 37). Letzterer trägt im Rahmen cholestatischer Lebererkrankungen, u.a durch Induktion des endogenen Metalloproteinase-Inhibitors TIMP-1, maßgeblich zur Entstehung einer Leberfibrose bei [182]. Die wesentlich stärker ausgeprägte Fibrose nach Ligatur des Gallenganges bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen könnte somit u.a. eine Folge der deutlich höheren TNF- α -Expression in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse fünf Tage nach BDL sein (Abb. 37). Darüber hinaus konnte bereits eine Beteiligung proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF- α , IFN- α) an der negativen Regulation nukleärer Rezeptoren, Arzneimittel-metabolisierender Enzyme und hepatischer Transporter demonstriert werden [183-185]. Insgesamt konnte anhand der ausgewählten Laborparameter und der Leberhistologien gezeigt werden, dass *tgUGT1A-SNP*-Mäuse im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen

eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Cholestase-induzierten hepatozellulären Schädigungen aufweisen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei wahrscheinlich die initial um 70% reduzierte Bilirubin-Konjugation im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen infolge des *UGT1A1*28*-Polymorphismus im humanen transgenen *UGT1A*-Lokus. Ob und inwiefern der erhöhte Anteil des indirekten (unkonjugierten) Bilirubins für den signifikanten Unterschied des Gesamtbilirubins zwischen *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen in der frühen postoperativen Phase nach BDL verantwortlich ist, ließe sich jedoch nur durch Wiederholung des Experimentes in *htgUGT1A*-Mäusen überprüfen, in denen der murine *Ugt1a*-Lokus ausgeschaltet wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse verwendet, in denen neben dem humanen transgenen *UGT1A*-Lokus in der WT- bzw. der SNP-Form (siehe 2.1.1) auch der murine *Ugt1a*-Lokus vorhanden ist. Ziel der Untersuchungen in diesem humanisierten *tgUGT1A*-Mausmodell war, neben der Klärung des Einflusses genetischer Varianten im *UGT1A*-Lokus auf die Symptomatik einer Cholestase, vor allem die Untersuchung der Auswirkungen einer mechanischen Galleabflussstörung auf die hepatische und intestinale Glukuronidierung. Dazu wurde in der Leber und im Darm *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse die mRNA-Expression humaner *UGT1A*-Gene im Gallengangsmodell analysiert.

In *tgUGT1A-WT*-Mäusen konnte dabei eine signifikante Aktivierung hepatischer UGTs nach BDL festgestellt werden, die zudem zeitabhängig und isoformspezifisch war (siehe 3.2.3). *TgUGT1A-SNP*-Mäuse zeigten in der frühen postoperativen Phase nach Ligatur des Gallenganges ebenfalls eine Induktion hepatischer *UGT1A*-Gene. Aufgrund der zehn Polymorphismen im humanen *UGT1A*-Lokus weisen sie im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen jedoch initial bereits ein wesentlich geringeres UGT-Expressionslevel in der Leber auf, so dass bei relativer Betrachtung die Heraufregulation der hepatischen *UGT1A*-Expression bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nicht ausreicht, um die Differenz gegenüber *tgUGT1A-WT*-Mäusen auszugleichen (Abb. 14, siehe 3.2.3).

In zahlreichen experimentellen und klinischen Studien zur obstruktiven Cholestase konnte bereits gezeigt werden, dass es infolge eines Mangels intestinaler Gallensäuren zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität kommt, die entscheidend zur bakteriellen Translokation und systemischen Endotoxämie (LPS) beiträgt [131-134]. Genauere Untersuchungen im Rahmen entzündlicher Lebererkrankungen des Menschen sowie der LPS-vermittelten Inflammation im Mausmodell haben zudem ergeben, dass ein

Anstieg der Endotoxin (LPS)-Konzentration im Allgemeinen zu einer negativen Regulation der Expression detoxifizierender *UGT1A*-Gene führt [186-188]. Um zu klären, welche Auswirkungen die mechanische Obstruktion des Gallenganges auf die intestinale Glukuronidierung hat, sollte in der vorliegenden Arbeit auch die *UGT1A*-mRNA-Expression im Jejunum und Kolon cholestatischer *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse analysiert werden.

Mittels Taqman-PCR konnte so auch in extrahepatischen Geweben (Jejunum, Kolon) *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach BDL eine differentielle und gewebespezifische Regulation humaner *UGT1A*-Gene gezeigt werden. Bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde darüber hinaus eine zeitlich verzögerte Induktion intestinal exprimierter UGTs beobachtet (siehe 3.2.4, Abb. 35 u. 36). Insgesamt zeigten sich die Unterschiede in der Expression intestinaler UGTs zwischen *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen am deutlichsten in der manifesten Cholestase (fünf Tage nach BDL). Bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde eine Heraufregulation extrahepatischer UGTs hauptsächlich für *UGT1A3* und *UGT1A4* (im Jejunum und Kolon) beobachtet, wobei im Kolon zusätzlich eine Aktivierung der *UGT1A1*- und *UGT1A7*-Expression gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen bis auf *UGT1A7* keine Induktion von *UGT1A*-Genen im Jejunum und Kolon detektiert (Abb. 35 u. 36). Stattdessen wurde eine deutlich verringerte Expression der *UGT1A1*-, *UGT1A3*- und *UGT1A6*-mRNA in Jejunum und Kolon sowie eine signifikante Herabregulation des *UGT1A4*-Gens im Jejunum nachgewiesen.

Welche Rolle LPS-vermittelte Entzündungsprozesse für die reduzierte Expression intestinaler UDP-Glukuronosyltransferasen während der Cholestase bei *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen spielen, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden. Die erhöhte Expression der proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-6 bei *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäusen fünf Tage nach BDL deutet zwar darauf hin, dass eine Entzündung vorliegt, allerdings sind zur Bestätigung des Zusammenhangs zwischen Cholestase-vermittelter Entzündung und verminderter Glukuronidierung zukünftig weitere Experimente erforderlich.

Da bekannt ist, dass die gewebespezifische Expression von UGTs aus der unterschiedlichen Kombination von Transkriptionsfaktoren bei der transkriptionellen Aktivierung resultiert, wurde fünf Tage nach Gallengangsligatur neben der Analyse hepatisch und extrahepatisch exprimierter *UGT1A*-Gene auch die Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-*

SNP-Mäuse untersucht. Im Rahmen von oxidativem Stress und Entzündungsprozessen kann die Expression und Liganden-vermittelte Aktivierung dieser DNA-bindenden Proteine positiv oder negativ beeinflusst werden, woraus schließlich eine Induktion oder Inhibition der *UGT1A*-Expression resultieren kann.

So konnte während der manifesten Cholestase sowohl bei *tgUGT1A-WT*- als auch bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen u.a. eine signifikante Inhibition der AhR-mRNA-Expression festgestellt werden (Abb. 38). Im Gegensatz dazu wurde bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen eine signifikante Erhöhung des Transkriptionsfaktors Nrf2 gemessen, der eine zentrale Bedeutung für die Abwehr von oxidativem Stress hat, welcher bei obstruktiver Cholestase zu vermehrter ROS-induzierter hepatozellulärer Nekrose und Apoptose führt [189]. Bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen blieb das Nrf2-Expressionslevel hingegen nahezu konstant (Abb. 38). Dies könnte möglicherweise auch eine Erklärung für die erhöhte Anzahl nekrotischer Bereiche in der Leber cholestatischer *tgUGT1A-SNP*-Mäuse sein, die im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen bereits in der frühen postoperativen Phase (24 Stunden nach BDL) auftrat (Vgl. Abb. 29-32).

Neben der Hemmung des AhR-Rezeptors wiesen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse außerdem eine signifikant verringerte Expression des Farnesoid-X-Rezeptors auf, der eine zentrale Rolle für die negative Regulation der Gallensäurebiosynthese über *CYP7A1* spielt. Daraus resultiert möglicherweise ein weiterer Anstieg toxischer Gallensäuren in der Leber [60, 61, Abb. 7]. Insgesamt wird die protektive Wirkung von *UGT1A*-Genen infolge einer koordinierten Regulation durch AhR und Nrf2 möglicherweise durch die Inhibition des Ah-Rezeptors während der Cholestase aufgehoben. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand von Induktionsexperimenten mit dem AhR-Liganden TCDD überprüft (Vgl. 3.4 und 4.2.2).

4.2.1 Toxizität des FXR-Agonisten GW4064 bei Cholestase im bei *tgUGT1A*-Mausmodell

Als einzige anerkannte Therapie zur Behandlung einer Cholestase PBC und PSC gilt derzeit die natürliche Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA), da sie durch Erniedrigung der hydrophoben Eigenschaften und der Toxizität der Galle zur Verbesserung der Leberwerte der Patienten führt [190, 191]. Insgesamt beruht der therapeutische Effekt der Ursodeoxycholsäure jedoch auf einer Kombination

zytoprotektiver, antiapoptotischer, immunmodulatorischer und choleretischer Effekte [190, 191]. Bislang konnte in klinischen Studien allerdings keine erhöhte Überlebensrate der mit UDCA behandelten Patienten erzielt werden [190, 193].

Es ist bekannt, dass die Regulation des Gallensäuremetabolismus im Wesentlichen über die Aktivierung des Gallensäurerezeptor FXR erfolgt. Dadurch können sowohl der Import und Efflux als auch die Biosynthese von Gallensäuren beeinflusst werden. Bei der tertiären Gallensäure UDCA handelt es sich jedoch im Gegensatz zur primären Gallensäure CDCA um keinen selektiven FXR-Agonisten [59].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss des synthetischen und potentiell protektiven FXR-Agonisten GW4064 bei obstruktiver Cholestase untersucht werden [177, 178]. Ein wesentliches Ziel war dabei zu klären, wie sich die intraperitoneale GW4064-Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Ligatur des Gallenganges auf die hepatische und intestinale Expression der UDP-Glukuronosyltransferasen auswirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die intraperitoneale Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse mit GW4064 in Abwesenheit einer mechanischen Abflussstörung zu einer Induktion hepatischer und extrahepatischer *UGT1A*-Gene führt (Vgl. Abb. 21-24). Entgegen den Erwartungen zur Protektivität des FXR-Agonisten bei manifester Cholestase konnte jedoch bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen durch GW4064-Behandlung keine weitere Heraufregulation hepatischer *UGT1A*-Gene erzielt werden (Abb. 44). Stattdessen wurde eine verringerte UGT-mRNA-Expression in der Leber (0,3- bis 0,9-fach) und im Darm (Jejunum: 0,4- bis 0,8-fach, Kolon: 0,6- bis 0,9-fach) festgestellt. Eine Induktion konnte lediglich im Kolon für *UGT1A4* (6,3-fach) und *UGT1A6* (1,4-fach) beobachtet werden (Abb. 46 u. 47).

Des Weiteren wurde neben einer erhöhten hepatischen Expression der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und FXR nach GW4064-Behandlung während der Cholestase wiederum eine Inhibition des AhR-Rezeptors detektiert, die bereits bei cholestatischen *tgUGT1A-WT*-Mäusen beobachtet werden konnte (Abb. 38 u. 49). Insgesamt wurde durch Behandlung *tgUGT1A-WT*-Mäuse mit dem FXR-Agonisten nach Gallengangsligatur die Inhibition des AhR-Rezeptors noch verstärkt, wodurch die koordinierte Regulation von *UGT1A*-Genen durch AhR und Nrf2 noch weiter beeinträchtigt wird [110]. Darüber hinaus deutet die deutlich erhöhte mRNA-Expression der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und TNF- α sowie der weitere Anstieg der Transaminaseaktivitäten (AST, ALT) und die erhöhte Anzahl nekrotischer

Bereiche in der Leberhistologie auf eine erhöhte Toxizität infolge der GW4064-Behandlung während der manifesten Cholestase hin.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu zahlreichen Studien, in denen ein positiver Effekt des FXR-Agonisten GW4064 bei Cholestase postuliert wird [177, 178]. So konnten *Modica et al.* 2012 in transgenen Mäusen zeigen, dass sich die selektive intestinale Aktivierung des FXR-Rezeptors bei extra- und intrahepatischer Cholestase protektiv auswirkt [179]. Ein wesentlicher Unterschied zur vorliegenden Arbeit ist dabei allerdings der Zeitpunkt der FXR-Aktivierung, welche über den FXR-FGF15/19-Signalweg zu einer Inhibierung der hepatischen Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) und damit der Gallensäurebiosynthese führt.

In einer Studie von *Chignard et al.* aus dem Jahr 2011 wurde darüber hinaus beobachtet, dass eine Aktivierung des FXR-Rezeptors in biliären Epithelzellen (*biliary epithelial cells*, BECs) zu einer erhöhten Expression des Rezeptors VPAC1 führt, der für die sekretorische Funktion der BECs erforderlich ist. Eine GW4064-vermittelte FXR-Aktivierung könnte so eine Stimulation des Gallenflusses (Choleresese) bewirken, die bei bereits bestehender Obstruktion des Gallenganges infolge des erhöhten biliären Drucks in einer Ruptur der Gallengänge (Cholangiolen) resultieren und dadurch zur Entwicklung von Gallen- und Leberschäden beitragen könnte [194]. Weitere Versuche in einem Mausmodell der obstruktiven Cholestase durch *Stedman et al.* konnten zudem zeigen, dass die Defizienz des FXR-Rezeptors zur Protektivität gegenüber Gallengangsligatur-vermittelten Leberschäden führt [195].

Im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen führte die GW4064-Behandlung nach BDL bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen erstaunlicherweise zu keinem weiteren Anstieg der Transaminaseaktivitäten bzw. einer weiteren Steigerung der mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren IL-6 und TNF- α (Vgl. Abb. 39 und 48). Histologisch konnte jedoch auch keine Verringerung des Cholestase-induzierten hepatozellulären Schadens beobachtet werden (Vgl. Abb. 31+32D sowie Abb. 42 und 43). Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen, die nach Gallengangsligatur und Behandlung mit GW4064 histologisch eine erhöhte Anzahl nekrotischer Bereiche (multiple Foki mit geringem Durchmesser) aufwiesen, zeigten cholestatische *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Injektion des FXR-Agonisten wenige zusammenhängende Leberzellnekrosen mit größerem Durchmesser (Vgl. Abb. 40 und 42 B).

Darüber hinaus konnte im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen eine Induktion aller hepatisch exprimierten *UGT1A*-Gene (2,2- bis 8,3-fach) sowie eine Heraufregulation

der *UGT1A3*- und *UGT1A4*-Expression im Jejunum *tgUGT1A-SNP*-Mäuse beobachtet werden, denen nach BDL intraperitoneal GW4064 injiziert wurde (Vgl. Abb. 44-46). Im Kolon wurde außerdem eine Steigerung der mRNA-Expression für *UGT1A1*, *UGT1A4* und *UGT1A6* nachgewiesen (Abb. 47). Da das Expressionslevel hepatischer *UGT1A*-Gene bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen aufgrund der zehn Polymorphismen im humanen *UGT1A*-Lokus bereits wesentlich niedriger als das von *tgUGT1A-WT*-Mäusen ist, führt die GW4064-Behandlung während der Cholestase auch nur zu einer relativen Steigerung detoxifizierender *UGT1A*-Gene. Diese ist hinsichtlich der Protektivität gegenüber Cholestase-induzierten hepatozellulären Schäden jedoch nicht ausreichend, sodass im Vergleich zu gallengangsligierten *tgUGT1A-SNP*-Mäusen keine Verbesserung der Symptomatik erzielt werden konnte. Eine mögliche Ursache hierfür ist möglicherweise auch die weitere Verringerung des AhR-Expressionslevels, die neben einer Induktion des FXR-Rezeptors auch schon bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen infolge der GW4064-Behandlung nach Gallengangsligatur beobachtet werden konnte (Abb. 49).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass UGT-vermittelte zytoprotektive Detoxifikationsmechanismen zwar durch Cholestase reguliert werden, die therapeutische Anwendung von FXR-Agonisten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium jedoch das Risiko für Leberschäden erhöhen. Die (Weiter)Entwicklung spezifischer Substanzen bzw. die Verbesserung bereits vorhandener Therapeutika zur Behandlung cholestatischer Lebererkrankungen ist daher dringend notwendig. Als aussichtsreicher Kandidat wird derzeit u.a. nor-Ursodeoxycholsäure (nor-UDCA), ein Derivat der Ursodeoxycholsäure gehandelt, da diese sowohl bei gallengangsligierten Mäusen als auch bei *Mdr2* (*ABCB4*) Knockout Mäusen, einem Modell der sklerosierenden Cholangitis, bereits deutlich bessere therapeutische Effekten erzielen konnte [196-198]. Aufgrund der veränderten physiologischen Eigenschaften und der unterschiedlichen Physikochemie im Vergleich zur ursprünglichen Ursodeoxycholsäure (UDCA) führte nor-UDCA in tierexperimentellen Studien bei mechanischer Cholestase bzw. sklerosierender Cholangitis zu einer deutlichen Verringerung der Leberschäden. *In vitro* konnte zudem die *UDP-Glukuronosyltransferase 1A3* (*UGT1A3*) als wesentlich für die hepatische Glukuronidierung der nor-Ursodeoxycholsäure verantwortliches Enzym identifiziert werden, wobei aus Mutationen im *UGT1A3*-Gen jeweils unterschiedliche Glukuronidierungsaktivitäten resultieren [199]. Ein weiterer potentieller Wirkstoff zur

Therapie cholestatischer Lebererkrankungen ist Obeticholsäure (*Obeticholic acid*, OCA, INT-747), eine Modifikation der Chenodeoxycholsäure. Vor allem für Patienten mit Primär Biliärer Zirrhose, die nur unzureichend auf die bisherige Behandlung mit UDCA ansprechen, stellt OCA eine neue, vielversprechende Therapieoption dar [200-202.]

4.2.2 AhR-vermittelte Modulation der Glukuronidierung bei obstruktiver Cholestase im *htgUGT1A*-Mausmodell

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor gehört zur Familie der *basic-Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim*-(bHLHPAS-)Proteine, die nach Bindung ihres Liganden in den Zellkern translozieren, um dort einen heterodimeren Komplex mit einem weiteren bHLHPAS-Protein (hier: AhR Nuklear Translokator, ARNT) zu bilden, der über xenobiotische Response Elemente (XREs) die Transkription von Zielgenen regulieren kann. Der stärkste Ligand des Ah-Rezeptors ist das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin, wobei in früheren Studien bereits eine TCDD-induzierte Heraufregulation von humanen *UGT1A*-Genen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte [173].

Des Weiteren wurde für einige *UGT1A*-Gene eine Interaktion zwischen dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor und dem Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) beobachtet, die bei cholestatichen Lebererkrankungen zu einer koordinierten Regulation der Glukuronidierung und somit zu einer erhöhten UGT-vermittelten Detoxifikation führen könnte. Die Aktivierung des AhR-Signalweges stellt somit einen weiteren möglichen Ansatzpunkt zur Behandlung mechanisch bedingter Gallenabflussstörungen dar. Zur genaueren Untersuchung des Effektes einer AhR-Aktivierung auf die Expression von *UGT1A*-Genen während der obstruktiven Cholestase wurden in der vorliegenden Arbeit *tgUGT1A*-Mäuse im Anschluss an die Gallengangsligatur intraperitoneal mit dem AhR-Liganden TCDD behandelt.

Während cholestatische *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach TCDD-Behandlung sowohl in der Leber (2,4- bis 33-fach) als auch im Darm (Jejunum 2,2- bis 6,4-fach, Kolon: 4,7- bis 24,2-fach) eine Induktion aller *UGT1A*-Gene aufwiesen, wurde bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen lediglich eine Heraufregulation der hepatischen *UGT1A1*-, *UGT1A6*- und *UGT1A9*-Expression (1,3- bis 4,0-fach) und der extrahepatischen *UGT1A*-Gene im Kolon (4,5- bis 10,1-fach) beobachtet (Vgl. Abb. 55, 56 u. 58). Im Jejunum *tgUGT1A-WT*-Mäuse blieb die UGT-Expression nach Gallengangsligatur und TCDD-Behandlung

dagegen nahezu konstant (Abb. 57). Insgesamt zeigten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse aufgrund der Polymorphismen im *UGT1A*-Lokus nach TCDD-Behandlung im Anschluss an die Gallengangsligatur jedoch ein geringeres absolutes Expressionslevel hepatischer und extrahepatischer (Kolon) UGTs im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen. Die deutlich erhöhten Serumtransaminaseaktivitäten sowie die verstärkte hepatozelluläre Lipidakkumulation im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen sind darüber hinaus ein Beleg dafür, dass die Steigerung des *UGT1A*-mRNA-Expressionslevels bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen über den AhR-Signalweg nicht ausreichend ist, um der TCDD-Toxizität bei obstruktiver Cholestase entgegenzuwirken (Abb. 50-54).

Im Gegensatz zu *tgUGT1A-SNP*-Mäusen wurde bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen nach intraperitonealer TCDD-Injektion im Anschluss an die Gallengangsligatur keine zusätzlich erhöhte Toxizität durch den AhR-Liganden während der Cholestase beobachtet. Im Rahmen einer Studie von Ozeki *et al.* aus dem Jahr 2011 führte die orale TCDD-Behandlung von Mäusen im Vorfeld einer BDL dagegen zu einer Verstärkung Gallensäure-induzierter Leberzellschäden [203]. Darüber hinaus wurde neben der erhöhten Produktion proinflammatorischer Cytokine eine Inhibition der für den Gallensäure-Metabolismus essentiellen Cytochrom-P450-Enzyme (CYP7A1, CYP3A11) sowie eine verringerte mRNA-Expression kanalikulärer Gallensäuretransporter beobachtet. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Effekte der TCDD-Behandlung im Gallengangsligaturmodell könnte neben der Applikationsmethode auch der Zeitpunkt der Verabreichung des AhR-Liganden sein. Um die genauen Mechanismen der AhR-vermittelten Toxizität und die Regulation detoxifizierender Phase-I- und Phase-II-Enzyme durch TCDD bei BDL zu verstehen, sind daher zukünftig weitere Studien notwendig.

Neben der Expressionsanalyse hepatischer und extrahepatischer UDP-Glukuronosyltransferasen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in der Leber cholestatischer *tgUGT1A*-Mäuse nach Behandlung mit dem AhR-Liganden untersucht. Dabei konnte eine deutliche Induktion der AhR-Expression in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse detektiert werden, während *tgUGT1A-SNP*-Mäuse eine signifikante Verringerung des hepatischen AhR-Levels aufwiesen. Des Weiteren wurde nach TCDD-Behandlung gallengangsligierter *tgUGT1A*-Mäuse eine Heraufregulation der FXR- und Nrf2-mRNA-Expression festgestellt, wobei die absolute Expression der

Transkriptionsfaktoren bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen deutlich höher war als bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen (Abb. 60).

Die Ergebnisse zur Regulation der Glukuronidierung bei obstruktiver Cholestase im *htgUGT1A*-Mausmodell liefern wichtige Erkenntnisse über den Einfluss funktioneller Polymorphismen im humanen *UGT1A*-Gen-Lokus bei cholestatischen Lebererkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass detoxifizierende UDP-Glukuronosyltransferasen in der Leber und im extrahepatischen Gastrointestinaltrakt *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse differentiell reguliert werden, wobei das Expressionslevel hepatischer *UGT1A*-Gene bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen aufgrund der zehn Polymorphismen im humanen *UGT1A*-Lokus initial bereits wesentlich niedriger als das von *tgUGT1A-WT*-Mäusen ist. Im Rahmen einer mechanischen Galleabflussstörung resultiert daraus eine erhöhte Suszeptibilität *tgUGT1A-SNP*-Mäuse gegenüber Cholestase-induzierten hepatozellulären Schädigungen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass *UGT1A*-Polymorphismen einen entscheidenden Einfluss auf das klinische Bild einer obstruktiven Cholestase haben. Eine Verbesserung der laborchemischen Parameter (Bilirubin, AST, ALT) sowie eine Verringerung der mit einer Cholestase einhergehenden Fibrose bei gallengangsligierten *tgUGT1A*-Mäusen konnte durch die Behandlung mit Agonisten des FXR- bzw. AhR-Rezeptors (GW4064 bzw. TCDD) nicht erreicht werden. In Zukunft ist daher eine noch genauere Aufklärung UGT-vermittelter Detoxifikationsmechanismen bei obstruktiver Cholestase und deren transkriptioneller Regulation erforderlich, da diese entscheidend für die Weiterentwicklung therapeutischer Strategien zur Behandlung cholestatischer Lebererkrankungen sind.

4.3 Regulation der Glukuronidierung während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie im *tgUGT1A* Mausmodell und Modulation durch FXR- und AhR-Agonisten

Bei der partiellen Hepatektomie (PHx) handelt es sich um ein selektives Operationsverfahren, welches u.a. zur Entfernung maligner Tumore (z.B. HCC, Lebermetastasen bei kolorektalen Karzinomen) angewendet wird [204]. Zur Abschätzung der Regenerationsleistung der Leber bezüglich des Metabolismus von

xeno- und endobiotischen Substanzen, z.B. im Fall einer OP-Indikation bei vorgeschädigter Leber (Tumorresektion in einer Leberfibrose, Resektion eines cholangiozellulären Karzinoms in einer cholestatischen Leber) sowie zur Vermeidung Medikamenten-assoziiierter Nebenwirkungen in der postoperativen Phase, sind Kenntnisse über den Einfluss der Leberregeneration auf detoxifizierende Enzyme, wie die UDP-Glukuronosyltransferasen, notwendig.

Erste Untersuchungen der Leberregeneration nach PHx wurden im experimentellen Bereich bereits in den 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts im Tiermodell durchgeführt [150, 151]. So ist inzwischen bekannt, dass Zytokine, die während des regenerativen Prozesses nach Hepatektomie freigesetzt werden, zur Regulation hepatischer UGTs beitragen können [205, 206]. Bezüglich der Expression und Aktivität der Phase-II-Enzyme während der Leberregeneration nach PHx liegen bislang jedoch nur sehr wenige und darüber hinaus kontroverse Daten vor [207-212]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der Expression humaner UDP-Glukuronosyltransferasen in der Leber und im Darm *htgUGT1A*-Mäuse während des regenerativen Prozesses im Anschluss an eine partielle Hepatektomie. Darüber hinaus sollte auch der Einfluss von *UGT1A*-Varianten, die Teil des Transgens der SNP-Mauslinie sind, auf die Leberregeneration nach PHx untersucht werden.

Infolge einer temporären Ischämie (Minderdurchblutung) der Leber während der Teilresektion konnte dabei in der frühen postoperativen Phase sowohl bei *tgUGT1A-WT*- als auch in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen eine signifikante Erhöhung der Serumtransaminaseaktivitäten (AST, ALT) gemessen werden, wobei *tgUGT1A-SNP*-Mäuse sechs Stunden nach Hepatektomie eine signifikant höhere ALT-Aktivität im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen aufwiesen (Abb. 61). Diese korreliert auch mit der histologisch erkennbaren erhöhten Anzahl hepatozellulärer Nekrosen im Bereich der Zentralvene bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen (Abb. 63 H 400x). Innerhalb von fünf Tagen konnte in beiden Mauslinien jedoch eine Normalisierung der Transaminaseaktivitäten beobachtet werden. Zur Überprüfung der Leberfunktion wurde neben der Analyse der AST- und ALT-Aktivität im Anschluss an die Leberteilektomie zusätzlich eine Messung des Gesamtbilirubins durchgeführt. Diese ergab im Serum *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse eine signifikante Erhöhung der Bilirubinkonzentration sechs und 48 Stunden nach partieller Hepatektomie, wobei *tgUGT1A-SNP*-Mäuse zum Zeitpunkt PHx48h im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen ein deutlich höheres Bilirubinlevel aufwiesen. Eine mögliche Ursache für den vorübergehenden Anstieg des Serumbilirubinlevels

nach PHx könnte u.a. ein verstärkter Gallensäurefluss sein [213]. Um diese Hypothese bestätigen zu können, ist jedoch eine Verifizierung der postoperativen Serumbilirubinlevel in zukünftigen Versuchen sowie eine zusätzliche Analyse der Expression hepatischer Transporter in *tgUGT1A*-Mäusen während der Leberregeneration nach PHx notwendig.

Insgesamt kann der Prozess der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in mehrere, aufeinander folgende Proliferationsphasen eingeteilt werden, während derer in mitotisch aktiven Hepatozyten eine Akkumulation von Lipiden beobachtet werden kann [152, 166, 214, 215]. Die Rolle der hepatischen Lipidakkumulation während der Leberregeneration wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert [159, 160, 214-220]. In der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich in Leberzellen *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse eine mikro- und makrovesikuläre Fetteinlagerung gezeigt werden (Abb. 63). Die maximale Proliferationsrate in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse wurde 48 bzw. 72 Stunden nach partieller Hepatektomie erreicht, wobei der prozentuale Anteil proliferierender Hepatozyten zwischen 55% und 70% lag (Abb. 62 und Abb. 64). Innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen (Versuchszeitpunkte nach PHx) bestand jedoch eine hohe interindividuelle Variabilität, deren Ursache bislang noch nicht geklärt werden konnte.

In einer Studie zur Untersuchung der Glukuronidierung während der Leberregeneration im Rattenmodell konnten *Tian et al.* 2005 bereits zeigen, dass sowohl die Aktivität als auch die mRNA-Expression hepatischer UGTs nach PHx differentiell reguliert wird [207, 208]. Um den Effekt der partiellen Hepatektomie auf die hepatische Glukuronidierung genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit nach Resektion des linken und des medianen Leberlappens (2/3) bei *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen die mRNA-Expression humaner *UGT1A*-Gene in der Leber der Versuchstiere postoperativ zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Dabei konnte eine zeitabhängige signifikante Induktion der *UGT1A1*-, *UGT1A6*- und *UGT1A9*-Gene sowie eine deutlich verringerte Expression der *UGT1A3*- und *UGT1A4*-mRNA in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse gemessen werden, wobei die stärkste Heraufregulation hepatischer UGTs 72 Stunden bzw. fünf Tage nach PHx detektiert wurde (Abb. 65). Zu diesem Zeitpunkt wurde auch eine Normalisierung der *UGT1A3*- und *UGT1A4*-mRNA-Expression gegenüber Sham-operierten Kontrolltieren beobachtet. Anhand dieser Daten wird deutlich, dass nach einer Leberteilektomie die metabolische Funktion der

verbliebenen Leber hinsichtlich der Detoxifikation noch nicht vollständig wiederhergestellt ist.

Im Gegensatz zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen zeigten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse bereits in der frühen postoperativen Phase während der Leberregeneration eine Induktion aller hepatisch exprimierten UGTs (Abb. 66). Eine Ausnahme bildeten dabei *UGT1A1* und *UGT1A9*, wobei Letztere in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nicht detektiert werden konnte. Darüber hinaus wurde 24 Stunden nach partieller Hepatektomie ein signifikant verringertes Expressionslevel für *UGT1A1* und *UGT1A6* gemessen. Insgesamt zeigten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse die stärkste Heraufregulation hepatisch exprimierter UGTs fünf Tage nach Hepatektomie. Die Expression des *UGT1A1*-Gens wurde dagegen nach 48 bzw. 72 Stunden am stärksten induziert. Wie bereits in 4.1 erwähnt, weisen *tgUGT1A-SNP*-Mäuse aufgrund der Polymorphismen im *UGT1A*-Lokus vor allem in der Leber ein im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen wesentlich geringeres *UGT1A*-mRNA-Expressionslevel auf (Vgl. Abb. 14, Abb. 65 und Abb. 66). Dadurch wird die Heraufregulation hepatischer UGTs bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen auch im Zusammenhang der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wieder relativiert.

In Übereinstimmung mit den Resultaten der Studie von *Tian et al.* lassen auch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur Regulation der hepatischen Glukuronidierung nach PHx darauf schließen, dass bei der Therapie von Patienten mit einer sich regenerierenden Leber im Anschluss an eine Lebertransplantation eine Dosisanpassung von Medikamenten erforderlich ist, die durch *UGT1A*-Gene metabolisiert werden. Dies gilt insbesondere für Träger des mit dem Gilbert-Syndrom assoziierten *UGT1A1*28*-Allels, die bereits unabhängig von einer partiellen Hepatektomie eine um 70% verminderte Glukuronidierungsaktivität gegenüber *UGT1A1*-Substraten aufweisen. Da das homozygote Vorliegen des *UGT1A1*28*-Polymorphismus in 76% der Fälle mit dem gleichzeitigen Auftreten der genetischen Varianten *UGT1A3-66 T<C*, *UGT1A6*2a* und *UGT1A7*3* assoziiert ist, besteht bei Patienten mit diesem Haplotyp nach PHx neben einem erhöhten Nebenwirkungsrisiko für *UGT1A1*-Substrate auch eine größere potentielle Gefahr für unerwünschte Arzneimittelwirkungen gegenüber Medikamenten, die der Metabolisierung durch *UGT1A3*, *UGT1A6* und *UGT1A7* unterliegen. Im Fall einer oralen Verabreichung von Pharmazeutika im Anschluss an eine partielle Hepatektomie müssen diese jedoch zunächst die Detoxifizierungssysteme innerhalb der gastrointestinalen Barriere passieren, bevor sie in Blut gelangen und schließlich zur Leber transportiert werden.

Zur Vermeidung Medikamenten-assoziiierter Nebenwirkungen nach PHx sind daher auch Kenntnisse über den Einfluss einer Leberteilresektion auf die Aktivität intestinaler UGTs erforderlich.

Im Rahmen einer Studie von *Catania et al.* aus dem Jahr 1998 konnte im Rattenmodell der partiellen Hepatektomie 48 Stunden nach PHx bereits ein signifikanter Anstieg der intestinalen UDP-Glukuronosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden, während in hepatischen Mikrosomen keine veränderte Aktivität gegenüber den *UGT1A*-Substraten Bilirubin bzw. p-Nitrophenol beobachtet wurde [209]. Diese Daten stehen z.T. im Widerspruch zu den Ergebnissen der bereits genannten Studie von *Tian et al.* (2005), mittels derer eine differentielle Regulation der Aktivität und mRNA-Expression hepatischer UGTs gezeigt werden konnte [207, 208]. Zur genaueren Untersuchung des Effektes der partiellen Hepatektomie auf die transkriptionelle Regulation intestinal exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen sollte daher in der vorliegenden Arbeit, neben der mRNA-Expression hepatischer *UGT1A*-Gene, auch die UGT-Expression im Darm humanisierter *tgUGT1A*-Mäuse analysiert werden.

Im Jejunum *tgUGT1A-WT*-Mäuse wurde dabei lediglich in der frühen postoperativen Phase nach Leberteilresektion (PHx 6h bis PHx 24h) eine Heraufregulation der mRNA-Expression detoxifizierender UDP-Glukuronosyltransferasen detektiert. Darüber hinaus zeigten *tgUGT1A-WT*-Mäuse 48 Stunden bis fünf Tage nach PHx ein deutlich verringertes *UGT1A*-mRNA-Expressionslevel im Vergleich zu Sham-operierten Kontrolltieren (siehe 3.5.4., Abb. 67). Im Jejunum *tgUGT1A-SNP*-Mäuse konnte in der frühen postoperativen Phase nach PHx ebenfalls eine Heraufregulation extrahepatisch exprimierter UGTs detektiert werden. Des Weiteren wurde eine Induktion der *UGT1A*-mRNA-Expression 24, 48 und 72 Stunden bzw. fünf Tage nach partieller Hepatektomie beobachtet (siehe 3.5.4., Abb. 67).

Die Analyse der *UGT*-Expression im Kolon *tgUGT1A-WT*-Mäuse im Anschluss an die Leberteilresektion ergab, mit Ausnahme der *UGT1A1*- und *UGT1A6*-Expression (PHx 24h), erneut eine signifikante Induktion der intestinalen *UGT1A*-Expression. Die stärkste Heraufregulation wurde dabei 48 Stunden (*UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A6*) bzw. 24 Stunden (*UGT1A7*) nach partieller Hepatektomie beobachtet (Abb. 68). Im Kolon *tgUGT1A-SNP*-Mäuse konnte, wie bereits anhand der Expression hepatischer *UGT1A*-Gene gezeigt, ein deutlich niedrigeres basales Expressionslevel humaner UGT im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen gemessen werden. In der frühen postoperativen Phase nach partieller Hepatektomie (PHx 6h) wurde darüber hinaus ein

signifikant verringertes *UGT1A1*-, *UGT1A3*- und *UGT1A6*-mRNA-Expressionslevel im Kolon *tgUGT1A-SNP*-Mäuse detektiert. Ab 24 Stunden nach partieller Hepatektomie zeigten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse jedoch eine deutliche Heraufregulation extrahepatisch exprimierter *UGT1A1*-, *UGT1A3*-, *UGT1A4*- und *UGT1A6*-Gene, wobei die stärkste UGT-Induktion im Kolon 72 Stunden und fünf Tage nach PHx gemessen wurde (Abb. 68). Die Daten zur Regulation intestinal exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen während der Leberregeneration nach PHx deuten darauf hin, dass die Aktivität intestinaler UGTs, vor allem in der frühen postoperativen Phase nach partieller Hepatektomie, möglicherweise eine alternative Strategie für den Metabolismus xeno- und endobiotischer Substanzen darstellen könnte. Die erhöhte UGT-Expression im Jejunum und Kolon *tgUGT1A*-Mäuse nach PHx spricht im Fall einer Verabreichung von *UGT1A*-Substraten jedoch auch für eine Anpassung der Medikamentendosis bei Patienten, die sich einer partiellen Hepatektomie unterzogen haben.

Um die molekularen Mechanismen weiter aufzuklären, die an der Regulation hepatisch und extrahepatisch exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen während der Leberregeneration beteiligt sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Expression der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und TNF- α sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren FXR, AhR und Nrf2 in der Leber und Darm *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach PHx untersucht. Letzterer spielt im Rahmen regenerativer Prozesse (Leberteilresektion, Transplantation) eine wesentliche Rolle für die Abwehr von oxidativem Stress und die Regulation der hepatozellulären Proliferation [221, 222]. So weisen Nrf2-Knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen u.a. eine verringerte Expression zytoprotektiver Enzyme in Hepatozyten auf, so dass es infolgedessen zu verstärkter Nekrose, erhöhtem oxidativem Stress und verzögerter hepatozellulärer Proliferation kommt, wodurch der Prozess der Leberregeneration negativ beeinflusst wird [223]. Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor dient im Rahmen der Leberregeneration hauptsächlich der Regulation des Zellzyklus, während durch die Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors die Aufrechterhaltung der Gallensäurehomöostase gewährleistet wird [224, 64].

Durch Untersuchung der hepatisch und extrahepatisch exprimierten Transkriptionsfaktoren während der Leberregeneration nach PHx konnte in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse zunächst ein signifikant verringertes AhR-, Nrf2- und FXR-Expressionslevel detektiert werden, das vor allem in der frühen postoperativen Phase nach partieller Hepatektomie deutlich inhibiert war. Ab 48 Stunden nach PHx konnte

jedoch eine Stabilisierung der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren beobachtet werden (Abb. 70). Diese Ergebnisse korrelieren mit dem „Einbruch“ der Expression humaner *UGT1A*-Gene in der Leber und im Darm *tgUGT1A-WT*-Mäuse in der frühen postoperativen Phase nach partieller Hepatektomie (Abb. 65-68). Eine Beteiligung des FXR, AhR und Nrf2 an der Regulation humaner *UGT1A*-Gene während der Leberregeneration nach PHx ist daher wahrscheinlich.

Im Gegensatz zur verringerten Expression der Transkriptionsfaktoren in der Leber wurde im Jejunum *tgUGT1A-WT*-Mäuse eine deutliche Heraufregulation des AhR-, Nrf2- und FXR-Expressionslevels nach partieller Hepatektomie (PHx6h, PHx48h, PHx72h) detektiert. Eine Ausnahme bildet die signifikant geringere Nrf2-mRNA-Expression 24 Stunden nach PHx (Abb. 71). In Korrelation zur hepatischen und extrahepatischen *UGT*-Expression *tgUGT1A-WT*-Mäuse in der frühen Phase nach PHx konnte im Kolon wiederum eine Inhibition der AhR-, Nrf2- und FXR-mRNA-Expression nach partieller Hepatektomie festgestellt werden, die sich ab 48 Stunden nach PHx wieder stabilisierte (Abb. 72).

Die zusätzliche Analyse der Entzündungsmediatoren in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse ergab eine signifikante Verringerung der TNF- α - Expression sechs, 24 und 72 Stunden nach Hepatektomie, während für IL-6 eine deutliche Heraufregulation sechs bis 48 Stunden nach PHx festgestellt wurde (Abb. 69). Zum Zeitpunkt PHx 72h wurde dagegen ein signifikant geringeres IL-6-Expressionslevel in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse gemessen. In gastrointestinalen Geweben konnte eine maximale Induktion der IL-6-mRNA-Expression 48 Stunden nach Hepatektomie detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Tierexperimentelle Studien zur Untersuchung der Rolle IL-6/gp130-abhängiger Signalwege während der Leberregeneration konnten bereits zeigen, dass eine Hyperstimulation mit Interleukin-6 die Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie hemmt. Im Gegensatz dazu wurde aber auch eine protektive Wirkung des IL-6/gp130-Signalweges auf sich regenerierende Hepatozyten nach PHx postuliert [225-227]. Welche Bedeutung die Aktivierung der IL-6/gp130/STAT3-Signalkaskade für die Regulation hepatisch und intestinal exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen während der Leberregeneration hat, ist bislang noch ungeklärt. *In vitro* konnte jedoch gezeigt werden, dass die Behandlung von Hepatozyten mit IL-6 zu einer dosis-abhängigen Reduktion der Glukuronidierungsaktivität führt [205]. Diese Daten korrelieren mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Inhibition von *UGT1A*-Genen in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse in der frühen postoperativen Phase nach

partieller Hepatektomie (Abb. 65, Abb. 69). In dieser Phase des regenerativen Prozesses nach PHx spielt auch der Tumornekrosefaktor- α eine entscheidende Rolle, da er durch die Aktivierung von NF-kappaB (NF- κ B) und c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) proinflammatorische Signale vermittelt und über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, c-Jun/AP-1 (Aktivatorprotein 1) und E2F1 (E2F Transkriptionsfaktor 1) an der Regulation des Zellzyklusproteins Cyclin D beteiligt ist [229]. Darüber kann die Freisetzung von TNF- α als Antwort auf die Gewebeverletzung bei partieller Hepatektomie infolge der Aktivierung neutrophiler Granulozyten zur Entstehung entzündlicher Reaktionen und somit zu postoperativen Komplikationen (Organversagen) beitragen [229]. *Fujita et al.* konnten 2001 im Rahmen einer Studie jedoch zeigen, dass die Defizienz des TNF α -Gens bei Mäusen nach PHx zu einer supprimierten Aktivierung von Neutrophilen führt, ohne den Prozess der Leberregeneration zeitlich zu verzögern [230]. Das in der vorliegenden Arbeit gemessene verringerte Expressionslevel des Tumornekrosefaktors- α in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach PHx hat daher vermutlich keinen negativen Effekt auf den regenerativen Prozess nach partieller Hepatektomie (Abb. 69). Es ist jedoch unklar, ob und inwiefern dadurch die Expression hepatischer UDP-Glukuronosyltransferasen beeinflusst wird.

Insgesamt zeigen die bisherigen Daten, dass der Prozess der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie nicht nur einen direkten Effekt auf die mRNA-Expression detoxifizierender UDP-Glukuronosyltransferasen in der Leber und im Darm *tgUGT1A*-Mäuse hat, sondern darüber hinaus auch die Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die für eine koordinierte Regulation hepatisch und extrahepatisch exprimierter UGT verantwortlich sind. Insbesondere in der frühen postoperativen Phase nach PHx konnten dabei deutliche Unterschiede hinsichtlich der *UGT1A*-Expression des Gastrointestinaltraktes bzw. der Leber festgestellt werden. Aufgrund der Bedeutung der Glukuronidierung für den Metabolismus zahlreicher Arzneimittel könnte die weitere Aufklärung der molekularen Regulationsmechanismen humaner *UGT1A*-Gene während der Leberregeneration zur Vermeidung unerwünschter Medikamenten-assoziiierter Nebenwirkungen und damit zur Verbesserung der postoperativen Pharmakotherapie nach partieller Hepatektomie beitragen.

4.3.1 FXR-vermittelte Modulation der Glukuronidierung während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie im *tgUGT1A*-Mausmodell

Der Farnesoid-X-Rezeptor ist bekannt für seine regulatorische Funktion im Zusammenhang mit dem Metabolismus und dem Transport von Gallensäuren [231]. Darüber hinaus spielt die Signaltransduktion über FXR in der Leber auch eine wesentliche Rolle für die Homöostase/Regeneration und die Karzinogenese [64, 232-234]. So konnten *Zhang et al.* 2012 im Modell der CCl₄-vermittelten Leberschädigung und nach partieller Hepatektomie zeigen, dass sowohl der hepatisch als auch der intestinal exprimierte Farnesoid-X-Rezeptor zur Regeneration des Lebergewebes beiträgt [64, 232]. Dabei führt die Aktivierung des leberspezifischen FXR zur Induktion des Transkriptionsfaktors *Forkhead Box m1b (Foxm1b)*, der, wie die meisten Mitglieder der Forkhead Box-(Fox-)Familie, eine entscheidende Funktion im Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation (Proliferation, Differenzierung, Lebensdauer) hat [64, 235, 236]. Im Darm wird durch Stimulation des Farnesoid-X-Rezeptors darüber hinaus der enterohepatische FGF15-Signalweg induziert, der infolge der Aufrechterhaltung der Gallensäurehomöostase während der Leberregeneration präventive Effekte hinsichtlich der Entstehung von Leberschäden vermittelt [Abb. 7; 64; 65].

Um den Einfluss einer FXR-vermittelten Regulation humaner *UGT1A*-Gene während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu untersuchen, wurden *tgUGT1A-WT*- bzw. *-SNP*-Mäuse nach Resektion des linken und medianen Leberlappens intraperitoneal mit GW4064 behandelt. Die Analyse laborchemischer Parameter, eine histologische Untersuchung des Lebergewebes (HE, Ki-67) und die Quantifizierung hepatisch und extrahepatisch exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen erfolgte 72 Stunden nach Hepatektomie.

Durch Behandlung *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse mit dem FXR-Agonisten im Anschluss an die partielle Hepatektomie konnte jedoch keine signifikante Verringerung des Bilirubinlevels bzw. der Serumtransaminasen gegenüber Kontrolltieren erzielt werden. Anhand der AST- und ALT-Aktivitäten *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach PHx und GW4064-Behandlung ließ sich lediglich ein Trend hinsichtlich der Absenkung der erhöhten Transaminasen erkennen (Abb. 73). Zur Bestätigung der Daten sind zukünftig jedoch weitere Messungen erforderlich.

Durch immunhistochemische Untersuchung des Ki-67-Proteins in der Leber *tgUGT1A*-Mäuse nach partieller Hepatektomie und Behandlung mit GW4064 konnte bei

tgUGT1A-WT-Mäusen eine im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte Anzahl proliferierender Hepatozyten nachgewiesen werden (Abb. 74, Abb. 76 A+B). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten bisheriger Studien zur Rolle des Farnesoid-X-Rezeptors während der Leberregeneration [232-236]. Im Gegensatz dazu konnte in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach PHx und GW4064-Behandlung keine Veränderung der hepatozellulären Proliferation beobachtet werden (Abb. 74, Abb. 78 A+B). Allerdings wiesen Kontrolltiere, die ab 24 Stunden nach PHx zwei Tage lang mit 10% DMSO / 90% Corn Oil i.p. injiziert wurden (sowohl bei *tgUGT1A-WT*- als auch *tgUGT1A-SNP*-Mäusen) eine signifikant verringerte Proliferationsrate auf, die möglicherweise auf DMSO als Bestandteil des verwendeten Lösungsvehikel zurückgeführt werden kann. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Hinsichtlich der Expression humaner *UGT1A*-Gene wurde in der Leber *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx72h) und Behandlung mit GW4064 eine Heraufregulation aller hepatisch exprimierten UGTs, mit Ausnahme der UDP-Glukuronosyltransferase *1A4* (1,0-fach) und des FXR-Zielgens *UGT1A3* (0,7-fach), gemessen (Abb. 79). Bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen führte die intraperitoneale Injektion mit dem FXR-Agonisten nach PHx dagegen zur Induktion aller *UGT1A*-Gene, einschließlich der UDP-Glukuronosyltransferase *1A3*, in der Leber (Abb. 80). Aufgrund des wesentlich geringeren *UGT1A*-mRNA-Expressionslevels infolge der Polymorphismen im *UGT1A*-Lokus wird die Heraufregulation der hepatischen UGTs in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach PHx und GW4064-Behandlung jedoch erneut relativiert (Vgl. 4.1 und Abb. 14). Insgesamt zeichnete sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit ab, dass die Behandlung *tgUGT1A-WT*-Mäuse mit dem FXR-Agonisten GW4064 im Anschluss an die durchgeführten operativen Eingriffe (BDL, PHx) zu einer Inhibition des hepatisch exprimierten *UGT1A3*-Gens führte, während in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse eine Heraufregulation der *UGT1A3* nach BDL bzw. PHx beobachtet wurde. Durch alleinige intraperitoneale GW4064-Behandlung konnte in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse keine *UGT1A3*-Induktion hervorgerufen werden, wohingegen *tgUGT1A-WT*-Mäuse eine 4,2-fache Induktion der Gallensäuren-glukuronidierenden *UDP-Glukuronosyltransferase 1A3* nach Injektion des FXR-Agonisten aufwiesen (Vgl. Abb. 23). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die unterschiedliche transkriptionelle Regulation des *UGT1A3*-Gens nach partieller Hepatektomie/ Ligatur des Gallenganges und GW4064-Behandlung in *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nicht nur eine

Folge des Promotorpolymorphismus im humanen *UGT1A*-Lokus *tgUGT1A-SNP*-Mäuse ist, sondern darüber hinaus durch bisher noch unbekannte Faktoren beeinflusst wird, die erst im Anschluss an operative Eingriffe, wie z.B. BDL und PHx, aktiviert werden.

Durch Untersuchung der UGT-mRNA-Expression in extrahepatischen Geweben *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse konnte ebenfalls eine differentielle Regulation der Glukuronidierung, einschließlich des FXR-Zielgens *UGT1A3*, festgestellt werden. Während im Jejunum *tgUGT1A-WT*-Mäuse nach PHx und GW4064-Behandlung neben einer deutlich geringeren *UGT1A1*-Expression eine Induktion der *UGT1A3*- und *UGT1A4*-mRNA detektiert wurde, resultierte die GW4064-Behandlung im Anschluss an die partielle Hepatektomie im Jejunum *tgUGT1A-SNP*-Mäuse in einer signifikanten Verringerung aller *UGT1A*-Gene (Abb. 80). Im Kolon *tgUGT1A-WT*-Mäuse führte die Behandlung mit GW4064 nach PHx wiederum zu einem signifikant verringerten Expressionslevel für *UGT1A3* (0,7-fach) und *UGT1A4* (0,2-fach) sowie einer Inhibition der *UGT1A7*-mRNA-Expression (0,6-fach). *TgUGT1A-SNP*-Mäuse wiesen im Vergleich dazu eine weitgehend stabile *UGT1A3*-Expression (0,9-fach) im Kolon auf (Abb. 82). Um die genauen Faktoren zu identifizieren, die zur unterschiedlichen Regulation humaner *UGT1A*-Gene in der Leber und im Darm *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration beitragen, sind zukünftig jedoch weitere Experimente notwendig.

4.3.2 AhR-vermittelte Modulation der Glukuronidierung während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie im *tgUGT1A*-Mausmodell

Der liganden-aktivierte Transkriptionsfaktor AhR zählt zur Familie der basic-Helix-Loop-Helix-Proteine und ist u.a. an der Vermittlung der Toxizität zahlreicher karzinogener und teratogener Substanzen, wie z.B. der des TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-dioxin), beteiligt [83].

Im Rahmen der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie spielt er darüber hinaus eine zentrale Rolle für die Regulation des Zellzyklus, wobei die resultierenden Effekte z.T. recht widersprüchlich sind [237]. Während in Abwesenheit exogener Liganden eine Förderung der Zellzyklus-Progression beobachtet wurde, führt die Aktivierung des Ah-Rezeptors durch spezifische Bindungspartner (TCDD, Benzo(a)pyren [BAP]) zu zahlreichen Störungen des Zellzyklus, wie z.B. der Blockade

der Phasenübergänge zwischen G0/G1 bzw. G2/M, der Inhibition der Zellproliferation sowie einer verringerten zellulären Kapazität bezüglich der DNA-Replikation [238]. Die Ursachen der Diskrepanz zwischen einer Liganden-unabhängigen und einer Liganden-vermittelten Regulation des Zellzyklus durch den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor konnten bislang jedoch nicht geklärt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer TCDD-induzierten Aktivierung des Ah-Rezeptors hinsichtlich der Expression humaner *UGT1A*-Gene während der Leberregeneration im *tgUGT1A*-Mausmodell zu untersuchen. Dazu wurden *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse im Anschluss an die partielle Hepatektomie intraperitoneal mit dem spezifischen AhR-Liganden injiziert. Die histologische Analyse der Leberpräparate (HE, Ki-67), die Diagnostik der Laborparameter und die Messung der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber bzw. im Darm der Versuchstiere wurden 72 Stunden nach PHx durchgeführt. Hinsichtlich der laborchemischen Parameter führte die Behandlung mit dem AhR-Liganden TCDD während der Leberregeneration jedoch zu keiner signifikanten Verringerung des Bilirubinlevels bzw. der Transaminaseaktivitäten im Serum *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 83). Bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde stattdessen ein weiterer Anstieg des AST- und ALT-Levels beobachtet, der auf eine Verstärkung des Leberschadens infolge der zusätzlichen TCDD-Injektion im Anschluss an die partielle Hepatektomie hindeutet.

Histologisch konnte eine erhöhte Anzahl nekrotischer Bereiche jedoch nur bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach PHx und TCDD-Behandlung nachgewiesen werden, während eine verstärkte hepatozelluläre Vakuolenbildung und Fetteinlagerung in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach Hepatektomie und Behandlung mit dem spezifischen AhR-Liganden zu erkennen waren (Abb. 85 A+B, 86 A+B). Durch immunhistochemische Detektion des Ki-67-Proteins konnte darüber hinaus eine Inhibition der proliferativen Aktivität sich regenerierender Hepatozyten in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach PHx und TCDD-Behandlung gezeigt werden (Abb. 84, Abb. 88 A+B). Bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde im Anschluss an die Leberteilektomie und die zusätzliche Behandlung mit TCDD dagegen eine signifikante Erhöhung der hepatozellulären Proliferation beobachtet (Abb. 84, Abb. 86 A+B). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Studien, in denen die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors durch spezifische Liganden zu einer negativen Regulation des Zellzyklus führte. So wurde in einer Studie von *Mitchell*

et al. gezeigt, dass die Behandlung von Mäusen mit TCDD im Vorfeld einer Hepatektomie in einer 50-75%-igen Inhibition der Leberregeneration resultiert. Auch nach Ablauf der frühen Phase der Leberregeneration („Priming Phase“, PHx 12h) konnte durch die orale Verabreichung des AhR-Liganden TCDD noch ein G1-Zellzyklus-Arrest hervorgerufen werden [224]. In einer weiteren Studie von *Huang et al.* wurde darüber hinaus festgestellt, dass der TCDD-induzierte G1-Zellzyklus-Arrest von der Proteinexpression des AhR-Bindungspartners ARNT abhängig ist [239]. Die genaue Ursache für den ausbleibenden antiproliferativen Effekt der TCDD-Behandlung im Anschluss an die partielle Hepatektomie bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Durch Analyse der mRNA-Expression detoxifizierender UDP-Glukuronosyltransferasen im Anschluss an die TCDD-Behandlung während der Leberregeneration nach PHx wurde in der Leber *tgUGT1A-WT*- und *-SNP*-Mäuse eine signifikante Heraufregulation aller *UGT1A*-Gene detektiert. Eine Ausnahme bildeten dabei *UGT1A7* bei *tgUGT1A-WT*-Mäusen und *UGT1A9* bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen (Abb. 89+ Abb. 90). In extrahepatischen Geweben (Jejunum, Kolon) *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse konnte nach Behandlung mit dem AhR-Agonisten im Anschluss an die partielle Hepatektomie wiederum eine differentielle Regulation humaner *UGT1A*-Gene beobachtet werden. Dabei wurde im Jejunum *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse nach PHx und TCDD-Injektion ein deutlich verringertes Expressionslevel für die Bilirubin-UDP-Glukuronosyltransferase *1A1*, das FXR-Zielgen *UGT1A3* sowie *UGT1A4* und *UGT1A7* gemessen. Eine Heraufregulation der UGT-mRNA-Expression konnte lediglich für *UGT1A3* (WT: 1,3-fach) und *UGT1A6* gezeigt werden (Abb. 91). Im Kolon *tgUGT1A*-Mäuse wurde nach Behandlung mit TCDD während der Leberregeneration eine signifikante Induktion der *UGT1A1*- (SNP: 2,4-fach), *UGT1A3*- und *UGT1A6*-Expression sowie ein deutlich verringertes Expressionslevel für *UGT1A4* und *UGT1A7* festgestellt (Abb. 92).

Die Ergebnisse der Behandlung *tgUGT1A*-Mäuse mit dem FXR-Agonisten GW4064 bzw. dem AhR-Liganden TCDD im Anschluss an die partielle Hepatektomie stehen z.T. im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Studien, in denen induzierende (FXR) bzw. inhibitorische (AhR) Effekte hinsichtlich der Leberregeneration nach PHx postuliert wurden. Die genauen Ursachen für die Unterschiede zwischen den im

Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten während der Leberregeneration im Vergleich zur Literatur konnten allerdings noch nicht geklärt werden.

Anhand der Expression humaner *UGT1A*-Gene in der Leber *tgUGT1A*-Mäuse konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Proliferations-unabhängig reguliert werden.

So wurde in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen nach partieller Hepatektomie durch Behandlung mit TCDD bzw. GW4064 eine Steigerung hepatisch exprimierter UDP-Glukuronosyltransferasen bei gleichzeitiger Inhibition der hepatozellulären Proliferation (TCDD) bzw. konstanter Proliferationsrate (GW4064) beobachtet. Die Heraufregulation der *UGT1A*-mRNA-Expression in der Leber *tgUGT1A-SNP*-Mäuse durch Injektion des FXR- bzw. AhR-Agonisten im Anschluss an die partielle Hepatektomie ist jedoch nicht ausreichend, um das geringere Expressionslevel hepatischer UGTs gegenüber *tgUGT1A-WT*-Mäusen auszugleichen.

Aufgrund der unzureichenden funktionellen Wirkung der Expressionssteigerung humaner *UGT1A*-Gene bei *tgUGT1A-SNP*-Mäusen durch GW4064 bzw. TCDD sowie der inhibitorischen Effekte bezüglich der hepatozellulären Proliferation (TCDD) scheint eine Aktivierung des FXR- bzw. AhR-Signalweges als therapeutischer Ansatz nach PHx, vor allem bei homozygoten Trägern des *UGT1A1**28-Polymorphismus (Gilbert-Meulengracht-Syndrom), eher ungeeignet. Es sollte daher Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Arbeiten sein, effektivere Möglichkeiten zur Aktivierung der Leberzellregeneration und zur Erhöhung der Glukuronidierungsleistung nach partieller Hepatektomie aufzuzeigen.

1. Literaturverzeichnis

1. Hildebrandt, R. Leber und exokrines Pankreas. In: Zilles, K., Tillmann, B.N. (2010) Anatomie, Springer Verlag, 488-496
2. Bosma, P.J., Seppen, J., Goldhoorn, B., Bakker, C., Oude Elferink, R.P., Chowdhury, J.R., Chowdhury, N.R., Jansen, P.L. (1994) Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man, *The Journal of Biological Chemistry* **269**(27), 17960-17964
3. Baumgärtner, W., (2007) Pathohistologie für die Tiermedizin, Enke Verlag
4. Rohen, J.W., Lütgen-Drecoll, E. (1999) Funktionelle Histologie - Kurzgefaßtes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, Schattauer Verlag, 3. Auflage, 288-303
5. Dancygier, H. (2003) Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen, Springer Verlag
6. Schwacha, H., Semmo, N. Gallenwege und exokrines Pankreas. In: Siegenthaler, W., Amann-Vesti, B.R. (2006) Klinische Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag, 890ff.
7. Adams, D.H., Eksteen, B. (2006) Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease, *Nature Reviews Immunology* **6**(3), 244-251
8. Rappaport, A.M., Wilson, W.D. (1958) The structural and functional unit in the human liver (liver acinus), *The Anatomical Record* **130**(4), 673-689
9. Rappaport, A.M. (1973) The microcirculatory hepatic unit, *Microvascular Research* **6**(2), 212-228
10. Rappaport, A.M. (1976) The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure, *Beiträge zur Pathologie* **157**(3), 215-243
11. Liebich, H.G. (1999) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Schattauer Verlag, 3. Auflage, Stuttgart, New York, 218-228
12. Dutton, G.J. (1980) Glucuronidation of drugs and other compounds, *CRC Boca Raton Press*, Boca Raton FL, 3-268
13. Ehmer, U. (2009) Dissertation: Genetics and metabolism: characterization of individual genetic variation of UDP-glucuronosyltransferase regulation in a humanized mouse model, Medizinische Hochschule Hannover
14. Langguth, P., Fricker, G., Wunderli-Allenspach, H. (2012) Biopharmazie, Wiley VCH, 67-117
15. Mojarrabi, B., Mackenzie, P. I. (1998) Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247**(3), 704-709
16. Strassburg, C.P., Manns, M.P., Tukey, R.H. (1998) Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic *UGT1A8*, *The Journal of Biological Chemistry* **273**(15), 8719-8726
17. Hanioka, N., Ozawa, S., Jinno, H., Ando, M., Saito, Y., Sawada, J. (2001) Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, *Xenobiotica* **31**(10), 687-699
18. Lankisch, T. O., Moebius, U., Wehmeier, M., Behrens, G., Manns, M. P., Schmidt, R. E., Strassburg, C. P. (2006) Gilbert's disease and atazanavir: From phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype, *Journal of Hepatology* **44**(5), 1324-1332

19. Guillemette, C. (2003) Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes, *The Pharmacogenomics Journal* **3**(3), 136-158
20. Nakamura, A., Nakajima, M., Yamanaka, H., Fujiwara, R., Yokoi, T. (2008) Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines, *Drug Metabolism and Disposition* **36**(8), 1461-1464
21. Strassburg, C.P., Oldhafer, K., Manns, M.P., Tukey, R.H. (1997) Differential Expression of the *UGT1A* Locus in Human Liver, Biliary and Gastric tissue: Identification of *UGT1A7* and *UGT1A10* Transcripts in Extrahepatic Tissue, *Molecular Pharmacology* **52** (2), 212-220
22. Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P., Tukey, R. H. (1998) Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase *UGT1A* Gene Locus in Human Gastric Epithelium, *Molecular Pharmacology* **54**(4), 647-654
23. Tukey, R.H., Strassburg, C.P. (2000) Human UDP-Glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**, 581-616
24. Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F., Nebert, D. W. (1997) The UDP glucosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence, *Pharmacogenetics* **7**(4), 255-269
25. Mackenzie, P., Little, J.M., Radomska-Pandya, A. (2003) Glucosidation of hyodeoxycholic acid by UDP-glucuronosyltransferase 2B7, *Biochemical Pharmacology* **65**(3), 417-421
26. Senafi, S.B., Clarke, D.J., Burchell, B. (1994) Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation, *The Biochemical Journal* **303**(Pt1), 233-240
27. Stoffel, W, Bosio, A. (1997) Myelin glycolipids and their functions, *Current Opinion in Neurobiology* **7**(5), 654-661
28. Monaghan, G., Clarke, D.J., Povey, S., See, C.G., Boxer, M., Burchell, B. (1994) Isolation of a human YAC contig encompassing a cluster of *UGT2*-genes and its regional localization to chromosome 4q13, *Genomics* **23**(2)
29. Gong, Q., Cho, J.W., Huang, T., Potter, C., Gholami, N., Basu, N.K., Kubota, S., Carvalho, S., Pennington, M.W., Owens, I.S., Popescu, N.C., (2001) Thirteen UDP-glucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus, *Pharmacogenetics* **11**(4), 357-368
30. Strassburg, C.P., Kalthoff, S., Ehmer, U. (2008) Variability and function of family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A), *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* **45**(6), 485-53
31. Meech, R., Mackenzie, P. I. (1998) Determinants of UDP glucuronosyltransferase membrane association and residency in the endoplasmic reticulum, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **356**(1), 77-85
32. Radomska-Pandya, A., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J. (2005) Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes, *Methods in Enzymology* **400**, 116-147
33. Meech, R., Mackenzie, P. I. (1997) Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **24**(12), 907-915

34. Ritter, J. K., Crawford, J. M., Owens, I. S. (1991) Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells, *The Journal of Biological Chemistry* **266**(2), 1043-1047
35. Uchaipichat, V., Mackenzie, P. I., Guo, X. H., Gardner-Stephen, D., Galetin, A., Houston, J. B., Miners, J. O. (2004) Human UDP-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents and inhibition by diclofenac and probenecid, *Drug Metabolism and Disposition* **32**(4), 413-423
36. Strassburg, C. P., Strassburg, A., Nguyen, N., Li, Q., Manns, M. P., Tukey, R. H. (1999) Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus, *The Biochemical Journal* **338** (Pt 2), 489-498
37. Strassburg, C. P., Kneip, S., Topp, J., Obermayer-Straub, P., Barut, A., Tukey, R. H., Manns, M. P. (2000) Polymorphic gene expression and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine, *The Journal of Biological Chemistry* **275**(46), 36164-36171
38. Wu, B., Kulkarni, K., Basu, S., Zhang, S., Hu, M. (2011) First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability, *Journal of Pharmacological Sciences* **100**(9), 3655-3681
39. Ehmer, U., Vogel, A., Schutte, J.K., Krone, B., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2004) Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4, *Journal of Hepatology* **39**(4), 970-977
40. Maitland, M.L., Grimsley, C., Kuttub-Boulos, H., Witonsky, D., Kasza, K.E., Yang, L., Roe, B.A., Di Rienzo, A. (2006) Comparative genomics analysis of human sequence variation in the UGT1A gene cluster, *The Pharmacogenomics Journal* **6**(1), 52-62
41. Thomas, S.S., Li, S.S., Lampe, J.W., Potter, J.D., Bigler, J. (2006) Genetic variability, haplotypes, and htSNPs for exons 1 at the human *UGT1A* locus, *Human Mutation* **27**(7), 717-731
42. Bosma, P.J., Chowdhury, J.R., Bakker, C., Gantla, S., de Boer, A., Oostra, B.A., Lindhout, D., Tytgat, G.N., Jansen, P.L., Oude Elferink, R.P., Chowdhury, N.R. (1995) The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome, *The New England Journal of Medicine* **333**(18), 1171-1175
43. Herold, G. *Innere Medizin* (2011), 505 ff.
44. Radu, P., Atsmon, J. (2001) Gilbert's syndrome – clinical and pharmacological implications, *The Israel Medical Association Journal* **3**(8), 593-598
45. Strassburg, C.P., Vogel, A., Kneip, S., Tukey, R.H., Manns, M.P. (2002) Polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer, *Gut* **50**(6), 851-856
46. Vogel, A., Kneip, S., Barut, A., Ehmer, U., Tukey, R.H., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2001) Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene, *Gastroenterology* **121**(5), 1136-1144
47. Kohle, C., Mohrle, B., Münzel, P.A., Schwab, M., Wernet, D., Badary, O.A., Bock, K.W. (2003) Frequent co-occurrence of the TATA box mutation associated with Gilbert's syndrome (UGT1A1*28) with other polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase-1 locus (UGT1A6*2 and UGT1A7*3) in Caucasians and Egyptians, *Biochemical Pharmacology* **65**(9), 1521-1527

48. Lampe, J.W., Bigler, J., Horner, N.K., Potter, J.D. (1999) UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1*28 and UGT1A6*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations, *Pharmacogenetics* **9**(3), 341-349
49. Lankisch, T.O., Vogel, A., Eilermann, S., Fiebeler, A., Krone, B., Barut, A., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2005) Identification and characterization of a functional TATA box polymorphism of the UDP glucuronosyltransferase 1A7 gene, *Molecular Pharmacology* **67**(5), 1732-1739
50. Guillemette, C., Ritter, J.K., Auyeung, D.J., Kessler, F.K., Housman, D.E. (2000) Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene, *Pharmacogenetics* **10**(7), 629-644
51. Erichsen, T.J., Ehmer, U., Kalthoff, S., Lankisch, T.O., Müller, T.M., Münzel, P.A., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2008) Genetic variability of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated regulation of the human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 gene, *Toxicology and Applied Pharmacology* **230**(2), 252-260
52. Gardner-Stephen, D.A., Mackenzie, P.I. (2007) Isolation of the UDP glucuronosyltransferase 1A3 and 1A4 proximal promoters and characterization of their dependence on the transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 alpha, *Drug Metabolism and Disposition* **35**(1), 116-120
53. Erichsen, T.J., Aehlen, A., Ehmer, U., Kalthoff, S., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2010) Regulation of the human bile acid UDP-glucuronosyltransferase 1A3 by the farnesoid X receptor and bile acids, *Journal of Hepatology* **52**(4), 570-578
54. Matsui, K., Maruo, Y., Sato, H., Takeuchi, Y. (2010) Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of *UGT1A1* as a cause of Gilbert syndrome, *BMC Gastroenterology* **10**, 57-66
55. Strassburg, C.P., Lankisch, T.O., Ehmer, U., Manns, M.P. (2008) Family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A): from Gilbert's syndrome to genetic organization and variability, *Archives of Toxicology* **82**(7), 415-433
56. Mackenzie, P.I., Hu, D.G., Gardner-Stephen, D.A. (2010) The regulation of UDP-glucuronosyltransferase genes by tissue-specific and ligand-activated transcription factors, *Drug Metabolism Reviews* **42**(1), 99-109
57. Krasowski, M.D., Ni, A., Hagey, L.R., Ekins, S. (2011) Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR, *Molecular and Cellular Endocrinology* **334**(1-2), 39-48
58. Lee, F.Y., Lee, H., Hubbert, M.L., Edwards, P.A., Zhang, Y. (2006) FXR, a multipurpose nuclear receptor, *Trends in Biochemical Sciences* **31**(10), 572-580
59. Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., Shan, B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids, *Science* **284**(5418), 1362-1365
60. Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R. (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis, *Molecular Cell* **6**(3), 517-526
61. Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., Mangelsdorf, D.J. (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors, *Molecular Cell* **6**(3), 507-515

62. Claudel, T., Trauner, M. (2009) Bile acids and their receptors. In: Dufour, J.F., Clavien, P.A. (eds.) *Signaling Pathways in Liver Diseases*, Springer Scientific Publishers, 317-332
63. Kim, I. Ahn, S.H., Inagaki, T., Choi, M., Ito, S., Guo, G.L., Kliewer, S.A., Gonzalez, F.J. (2007) Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver in intestine, *Journal of Lipid Research* **48**(12), 2664-2672
64. Zhang, L., Wang, Y.D., Chen, W.D., Wang, X., Lou, G., Liu, N., Lin, M., Forman, B.M., Huang, W. (2012) Promotion of liver regeneration/repair by farnesoid X receptor in both liver and intestine in mice, *Journal of Hepatology* **56**(6), 2336-2343
65. Schaap, F.G., Leclercq, I.A., Jansen, P.L.M., Olde Damink, S.W. (2013) Prometheus' little helper, a novel role for fibroblast growth factor 15 in compensatory liver regrowth, *Hepatology* **59**(5), 1121-1123, Original article: Uriarte et al. (2013) Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice, *Gut* **62**(6), 899-910
66. Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., Wilson, T.M., Koller, B.H., Kliewer, S.A. (2001) The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity, *PNAS* **98**(6), 3369-3374
67. Xie, W., Radominska-Pandya, A., Shi, Y. (2001) An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids, *PNAS* **98**(6), 3375-3380
68. Makishima, M. Lu, T.T., Xie, W., Whitfield, G.K., Domoto, H., Evans, R.M., Haussler, M.R., Mangelsdorf, D.J. (2002) Vitamin D Receptor as an intestinal bile acid sensor, *Science* **296**(5571), 1313-1316
69. Uppal, H., Toma, D., Saini, S.P., Ren, S. Jones, T.J. Xie, W. (2005) Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice, *Journal of Hepatology* **41**(1), 168-176
70. Zhang, J., Huang, W., Quatani, M., Evans, R.M., Moore, D.D. (2004) The constitutive androstane receptor and pregnane x receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity, *The Journal of Biological Chemistry* **279**(47), 49517-49522
71. Jung, D., Mangelsdorf D.J., Meyer, U.A. (2006) Pregnane X Receptor is a target of farnesoid x receptor, *Journal of Biological Chemistry* **281**(28), 19081-19091
72. Sonoda, J., Xie, W., Rosenfeld, J.M., Barwick, J.L., Guzelian, P.S., Evans, R.M. (2002) Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR), *PNAS* **99**(21), 13801-13806
73. Renga, B., Migliorati, M., Mencarelli, A., Cipriani, S., D'Amore, C., Distrutti, E., Fiorucci, S. (2011) Farnesoid X receptor suppresses constitutive androstane receptor activity at the multidrug resistance protein-4 promoter, *Biochimica et Biophysica Acta* **1809**(3), 157-65
74. Kay, H.Y., Kim, W.D., Hwang, S.J., Choi, H.-S., Gilroy, R.K., Wan, Y.-J. Y., Kim, S.G. (2011) Nrf2 inhibits LXR α -dependent hepatic lipogenesis by competing with FXR for acetylase binding, *Antioxidants & Redox Signaling* **15**(8), 2135-2146

75. Trottier, J., Verreault, M., Grepper, S., Monte, D., Belanger, J., Kaeding, J., Caron, P., Inaba, T.T., Barbier, O. (2006) Human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A3 enzyme conjugates chenodeoxycholic acid in the liver, *Journal of Hepatology* **44**(5), 1158-1170
76. Ramadoss, P., Marcus, C., Perdew, G.H. (2005) Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* **1**(1), 1-13
77. Faust, D., Kletting, S., Ueberham, E., Dietrich, C. (2013) Aryl hydrocarbon receptor-dependent cell cycle arrest in isolated mouse oval cells, *Toxicology Letters* **223**(1), 73-80
78. Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., Andersson, P., Ittrich, C., Poellinger, L., Schwarz, M. (2004) A Constitutively Active Dioxin/Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Hepatocarcinogenesis in mice, *Cancer Research* **64**, 4707-4710
79. Bock, K.W., Köhle, C. (2005) Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis, *Biochemical Pharmacology* **69**(10), 1403-1408
80. Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor, *Science* **268**(5211), 722-726
81. Quintana, F.J. (2013) The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune system, *Immunology* **138**(3), 183-189
82. Petrusis, J.R., Perdew, G.H. (2002) The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex, *Chemico-Biological Interactions* **141**(1-2), 25-40
83. Whitlock, J.P. Jr. (1990) Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin action, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **30**, 251-277
84. Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., (2005) Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**(1), 311-317
85. Yao, E.F., Denison, M.S. (1992) DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer, *Biochemistry* **31**(21), 5060-5067
86. Shen, E.S., Whitlock, J.P. Jr. (1992) Protein-DNA interactions at a dioxin responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor, *The Journal of Biological Chemistry* **267**(10), 6815-6819
87. Emi, Y., Ikushiro, S., Iyanagi, T. (1996) Xenobiotic responsive element-mediated transcriptional activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex, *The Journal of Biological Chemistry* **271**(7), 3952-3958
88. Grams, B., Harms, A., Braun, S., Strassburg, C.P., Manns, M.P., Obermayer-Straub, P. (2000) Distribution and inducibility by 3-methylcholanthrene of family 1 UDP-glucuronosyltransferases in the rat gastrointestinal tract, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **377**(2), 255-265
89. Münzel, P.A., Lehmköster, T., Bruck, M., Ritter, J.K., Bock, K.W. (1998) Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **350**(1), 72-78

90. Münzel, P.A., Schmohl, S., Buckler, F., Jaehrling, J., Raschko, F.T., Kohle, C., Bock, K.W. (2003) Contribution of the Ah receptor to the phenolic antioxidant-mediated expression of human and rat UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 in Caco-2 and rat hepatoma 5L cells, *Biochemical Pharmacology* **66**(5), 841-847
91. Chen, S., Beaton, D., Nguyen, N., Senekeo-Effenberger, K., Brace-Sinnokrak, E., Argikar, U., Rimmel, R.P., Trottier, J., Barbier, O., Ritter, J.K., Tukey, R.H. (2005) Tissue-specific, inducible, and hormonal control of the human UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) locus, *The Journal of Biological Chemistry* **280**(45), 37547-37557
92. Sugatani, J., Yamakawa, K., Tonda, E., Nishitani, S., Yoshinari, K., Degawa, M., Abe, I., Noguchi, H., Miwa, M. (2004) The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics, *Biochemical Pharmacology* **67**(5), 989-1000
93. Lankisch, T.O., Gillman, T.C., Erichsen, T.J., Ehmer, U., Kalthoff, S., Freiberg, N., Münzel, P.A., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2008) Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated regulation of the human estrogen and bile acid UDP-glucuronosyltransferase 1A3 gene, *Archives of Toxicology* **82**(9), 573-582
94. Breimer, L. H. (1990) Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage, *Molecular Carcinogenesis* **3**(4), 188-1972
95. Yu, X., Kensler, T. (2005) Nrf2 as target for cancer prevention, *Mutation Research* **591**(1-2), 93-102
96. Luedde, T., Trautwein, C. (2006) The role of oxidative stress and antioxidant treatment in liver surgery and transplantation, *Liver transplantation* **12**(12), 1733-1735
97. Zhu, R., Wang, Y., Zhang, L., Guo, Q. (2012) Oxidative stress and liver disease, *Hepatology Research* **42**(8), 741-749
98. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes & Development* **13**(1), 76-86
99. Marini, M. G., Chan, K., Casula, L., Kan, Y. W., Cao, A., Moi, P. (1997) hMAF, a small human transcription factor that heterodimerizes specifically with Nrf1 and Nrf2, *The Journal of Biological Chemistry* **272**(26), 16490-16497
100. Nguyen, T., Sherratt, P. J., Pickett, C. B. (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43**, 233-260
101. Venugopal, R., Jaiswal, A. K. (1998) Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes, *Oncogene* **17**(24), 3145-3156
102. Weerachayaphorn, J., Mennone, A., Soroka, C.J., Harry, K., Hagey, L.R., Kensler, T.W., Boyer, J.L. (2012) Nuclear factor-E2-related factor 2 is a major determinant of bile acid homeostasis in the liver and the intestine, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **302**(9), G925-G936
103. Chan, K., Han, X.D., Kan, Y.W. (2001) An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen, *PNAS* **98**(8), 4611-4616

104. Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T., Yamamoto, M. (2001) High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug-metabolizing enzymes and antioxidant genes, *Toxicological Sciences* **59**(1), 169-177
105. Okawa, H., Motohashi, h., Kobayashi, A. Aburatani, H., Kensler, T.W., Yamamoto, M. (2006) Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **339**(1), 79-88
106. Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Maher, J.M., Dieter, M.Z., Knight, T.R., Goedken, M., Cherrington, N.J., Chan, J.Y., Klaassen, C.D., Manautou, J.E. (2006) Nuclear factor-E2-related factor 2 expression is critical for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 during cholestasis, *Cell Stress & Chaperones* **11**(4), 356-363
107. Buckley, D.B., Klaassen, C.D. (2009) Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2, *Drug Metabolism and Disposition* **37**(4), 847-856
108. Yueh, M.F., Tukey, R.H. (2007) Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression *in vitro* and in transgenic *UGT1* mice, *The Journal of Biological Chemistry* **282**(12), 8749-8758
109. Yeager, R.L., Reisman, S.A., Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D. (2009) Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery", *Toxicological Sciences* **111**(2), 238-246
110. Kalthoff, S., Ehmer, U., Freiberg, N., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2010) Coffee induces expression of glucuronosyltransferases via the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach, *Gastroenterology* **139**(5), 1699-1710
111. Strassburg, C.P., Kalthoff, S. (2012) UDP-Glucuronosyltransferases in: Anzenbacher, P., Zanger, U.M. Metabolism of drugs and other xenobiotics, Wiley-VCH, 67-116
112. Gunn C.H. (1938) Jaundice in the rat, *Journal of Heredity* **29**(4), 137-140
113. Iyanagi, T. (1991) Molecular basis of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme deficiencies in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat), *The Journal of Biological Chemistry* **266**(35), 24048-24052
114. Roy-Chowdhury, J., Huang, T.J., Kesari, K., Lederstein, M., Arias, I.M., Roy-Chowdhury, N. (1991) Molecular basis for the lack of bilirubin-specific and 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase activities in Gunn rats. The two isoforms are encoded by distinct mRNA species that share an identical single base deletion, *The Journal of Biological Chemistry* **266**(27), 18294-18298
115. Mackenzie, P.I., Owens, I.S. (1983) Differences in UDP-glucuronosyltransferase activities in congenic inbred rats homozygous and heterozygous for the jaundice locus, *Biochemical Pharmacology* **32**(24), 3777-3781
116. Crigler, J.F., Najjar, V.A. (1952) Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus, *Pediatrics* **10**(2), 169-179

117. Senekeo-Effenberger, K., Chen, S., Brace-Sinnokrak, E., Bonzo, J.A., Yueh, M.F., Argikar, U., Kaeding, J., Trottier, J., Rimmel, R.P., Ritter, J.K., Barbier, O., Tukey, R.H. (2007) Expression of the human UGT1 locus in transgenic mice by 4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthioacetic acid (WY-14643) and implications on drug metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation, *Drug Metabolism and Disposition* **35**(3), 419-427
118. Verreault, M., Senekeo-Effenberger, K., Trottier, J., Bonzo, J.A., Belanger, J., Kaeding, J., Staels, B., Caron, P., Tukey, R.H., Barbier, O. (2006) The liver X-receptor alpha controls hepatic expression of the human bile acid-glucuronidating UGT1A3 enzyme in human cells and transgenic mice, *Journal of Hepatology* **44**(2), 368-378
119. Nguyen, N., Bonzo, J.A., Chen, S., Chouinard, S., Kelner, M.J., Hardiman, G., Bélanger, A., Tukey, R. (2008) Disruption of the Ugt1 Locus in Mice resembles Human Crigler Najjar Type I Disease, *The Journal of Biological Chemistry* **283**(12), 7901-7911
120. Cai, H., Nguyen, N., Peterkin, V., Yang, Y.S., Hotz, K., La Placa, D.B., Chen, S., Tukey, R.H., Stevens, J.C. (2010) A humanized *UGT1* mouse model expressing the *UGT1A1*28* allele for assessing drug clearance by UGT1A1-dependent glucuronidation, *Drug Metabolism and Disposition* **38**(5), 879-886
121. Lankisch, T.O., Schulz, C., Zwingers, T., Erichsen, T.J., Manns, M.P., Heinemann, V., Strassburg, C.P. (2008) Gilbert's syndrome and irinotecan toxicity: combination with UDP-glucuronosyltransferase 1A7 variants increases risk, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **17**(3), 695-701
122. Lankisch, T.O., Behrens, G., Ehmer, U., Möbius, U., Rockstroh, J., Wehmeier, M., Kalthoff, S., Freiberg, N., Manns, M.P., Schmidt, R.E., Strassburg, C.P. (2009) Gilbert's syndrome and hyperbilirubinemia in protease inhibitor therapy - an extended haplotype of genetic variants increases risk in indinavir treatment, *Journal of Hepatology* **50**(5), 1010-1018
123. Ehmer, U., Kalthoff, S., Fakundiny, B., Pabst, B., Freiberg, N., Naumann, R., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2012) Gilbert syndrome redefined: a complex genetic haplotype influences the regulation of glucuronidation, *Journal of Hepatology* **55**(6), 1912-1921
124. Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., Schoonjans, K., (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases, *Nature Reviews Drug Discovery* **7**(8), 678-693
125. Houten, S.M., Auwerx, J. (2004) The enterohepatic nuclear receptors are major regulators of the enterohepatic circulation of bile salts, *Annals of Medicine* **36**(7), 482-491
126. Dawson, P.A., Hubbert, M.L., Rao, A. (2010) Getting the mOST from OST: Role of organic solute transporter, OST α -OST β , in bile acid and steroid metabolism, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Physiology of Lipids* **1801**(9), 994-1004
127. Böcker, W., (2008) Repetitorium Pathologie, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2. Auflage, S. 32 ff.
128. Trauner M., Meier P.J., Boyer J.L. (1998) Molecular Pathogenesis of Cholestasis, *The New England Journal of Medicine* **339**(17), 1217-1227
129. Paumgartner, G. (2006) Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets, *World Journal Gastroenterology* **12**(28), 4445-4451
130. Perez, M.J., Briz, O. (2009) Bile acid-induced cell injury and protection, *World Journal Gastroenterology* **15**(14), 1677-1689

131. Deitch, E.A., Sittig, K., Li, M., Berg, R., Specian, R.D. (1990) Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut, *American Journal of Surgery* **159**(1), 79-84
132. Lichtman, S.T., (2001) Bacterial Translocation in humans, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **33**(1), 1-10
133. Assimakopoulos, S.F., Vagianos, C.E., Nikolopoulo, V.N. (2007) Intestinal barrier dysfunction on obstructive jaundice: concepts in pathophysiology and potential therapies, *Annals of Gastroenterology* **20**(2), 116-123
134. Fouts, D.E., Torralba, M., Nelson, K.E., Brenner, D.A., Schnabl, B. (2012) Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease, *Journal of Hepatology* **56**(6), 1283-1292
135. Gerok, W., Huber, C. Meinertz, T., Zeidler, H., (2007), Die Innere Medizin, Schattauer Verlag GmbH, 11. Auflage, 619-622
136. Krawczyk, M., Müllenbach, R., Weber, S.N., Zimmer, V., Lammert, F. (2010) Genome-wide association studies and risk assessment of liver disease, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **7**(12), 669-681
137. Stender, S. Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A. (2013) Extreme bilirubin levels as causal risk factor for symptomatic gallstone disease, *JAMA Internal Medicine* **173**(13), 1222-1228
138. Buch, S., Schafmayer, C., Völzke, H., Seeger, M., Miquel, J.F., Sookoian, S.C., Egberts, J.H., Arlt, A., Pirola, C.J., Lerch, M.M., John, U., Franke, A., von Kampen, O., Brosch, M., Nothnagel, M., Kratzer, W., Boehm, B.O., Bröring, D.C., Schrieber, S., Krawczak, M., Hampe, J. (2010) Loci from a genome-wide analysis of bilirubin levels are associated with gallstone risk and composition, *Gastroenterology* **139**(6), 1942-1951
139. Jacoby, I. Scott, T.E. (1993) NIH Consensus conference on laparoscopic cholecystectomy: are reforms necessary, *The Journal of the American Medical Association* **270**(3), 320-321
140. (2007) Society for Surgery of the alimentary tract, SSAT patient guidelines, Treatment of gallstone and gallbladder disease, *Journal of Gastrointestinal Surgery* **11**(9), 1222-1224
141. Trauner, M., Wagner, M., Fickert, P., Zollner, G. (2005) Molecular Regulation of hepatobiliary transport systems: Clinical applications for understanding and treating cholestasis, *Journal of Clinical Gastroenterology* **39**(4 Suppl. 2), 111-124
142. (2009) EASL clinical practice guidelines: Management of cholestatic liver diseases, *Journal of Hepatology* **51**, 237-267
143. Geier, A., Trautwein, C. Leberzelluntergang und – regeneration, In: Riemann, J.F., Fischbach, W., Galle, P.R., Mössner, J. (2007) Gastroenterologie in Klinik und Praxis, Band 2: Leber, Galle, Pankreas, Thieme Verlag, 1237-1246
144. Trotter, J.F., Wachs, M., Everson, G.T., Kam, I. (2002) Adult-to-adult Transplantation of the right hepatic lobe from a living donor, *The New England Journal of Medicine* **346**(14), 1074-1082
145. Murray, K.F., Carithers, R.L. (2005) AASLD Practice Guidelines: Evaluation of the Patient for Liver Transplantation, *Journal of Hepatology* **41**(6), 1-26
146. Walter, J., Burdelski, M., Bröring, D.C. (2008) Chancen und Risiken der Leber-Lebendspende-Transplantation, *Deutsches Ärzteblatt* **105**(6), 101-107
147. Annual Report 2012 Eurotransplant International Foundation, ed. by Axel Rahmel
148. <http://www.lebertransplantation.eu/leberspende-und-lebertransplantation.html>

149. Michalopoulos, G.K. Liver Regeneration (2007) *Journal of Cellular Physiology* **213**(2), 286-300
150. Higgins, G.M., Anderson, R.M. (1931) Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver in the white rat following partial surgical removal, *Archives of Pathology* **12**(2), 186-202
151. Mitchell, C., Willenbring, H., (2008) A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice, *Nature Protocols* **3**(7), 1167-1170
152. Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C., (1997) Liver regeneration, *Science* **276**(5309), 60-66
153. Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J., (2006) Liver regeneration, *Journal of Hepatology* **43**(S1), 45-53
154. Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L.F., Fox, R., Lee, D.C., Campbell, J.S., Fausto, N., (2005) Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration, *The Journal of Biological Chemistry* **280**(4), 2662-2668
155. Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., Okamura, H., (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo, *Science* **302**(5643), 255-259
156. Selzner, M., Clavien, P.A., (2000) Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway, *Journal of Hepatology* **31**(1), 35-42
157. Yang, S.Q., Lin, H.Z., Mandal, A.K., Huang, J., Diehl, A.M. (2001) Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology, *Journal of Hepatology* **34**(4 Pt1), 694-706
158. DeAngelis, R.A., Markiewski, M.M., Taub, R., Lambris, J.D. (2005) A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha, *Journal of Hepatology* **42**(5), 1148-1157
159. Shteyer, E., Liao, Y, Muglia, L.J., Hruz, P.W., Rudnick, D.A. (2004) Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice, *Journal of Hepatology* **40**(6), 1322-1332
160. Schmucker, D.L., Sanchez, H. (2011) Liver regeneration and Aging: A Current perspective, *Current Gerontology and Geriatrics Research* **2011**(526379), 1-8
161. Yamanaka, N., Okamoto, E., Kawamura, E., Kato, T., Oriyama, T., Fujimoto, J., Furukawa, K., Tanaka, T., Tomoda, F., Tanaka, W. (1993) Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function, *Journal of Hepatology* **18**(1), 79-85
162. Pomfret, E.A., Pomposelli, J.J., Gordon, F.D., Erbay, N., Price, L.L., Lewis, W.D., Jenkins, R.L. (2003) Liver regeneration and surgical outcome in donors of right lobe liver grafts, *Transplantation* **76**(1), 5-10
163. Chen, M.F., Hwang, T.L., Hung, C.F. (1991) Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography, *Annals of Surgery* **213**(3), 227-229
164. Sowa, J. P. (2010), Dissertation: Untersuchungen zur Leberregeneration nach Leberteileresektion, Universität Duisburg Essen
165. Vacca, M., Degirolamo, C., Massafra, V., Polimeno, L. Mariani-Constantini, R., Palsaciano, G., Moschetta, A. (2013) Nuclear receptors in regenerating liver and hepatocellular carcinoma, *Molecular and Cellular Endocrinology* **368**(1-2), 108-119

166. Tarlá, M.R., Ramalho, F.S., Zambelli Ramalho, L.N., Castro e Silva, T., Ferracioli Brandao, D., Ferreira, J., Castro e Silva, O., Zucoloto, S. (2006) A molecular view of liver regeneration, *Acta Cirurgica Brasileira* **21**(Suppl.1), 58-62
167. Taub, R. (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**(10), 836-847
168. Russell, W.E., Coffey, Jr., R.J., Ouelette, A.J., Moses, H.L. Moses (1988) Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat, *PNAS* **85**(14), 5126-5130
169. Nishikawa, Y., Wang, M., Carr, B.I. (1998) Changes in TGF-beta receptors of rat hepatocytes during primary culture and liver regeneration: increased expression of TGF-beta receptors associated with increased sensitivity to TGF-beta-mediated growth inhibition, *Journal of Cellular Physiology* **176**(3), 612-623
170. Oe, S., Lemmer, E.R., Conner, E.A., Factor, V.M., Levéen, P., Larsson, J., Karlsson, S., Thorgeirsson, S.S. (2004) Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration, *Journal of Hepatology* **40**(5), 1098-1105
171. Yasuda, H., Mine, T., Shibata, H., Eto, Y., Hasegawa, Y., Takeuchi, T., Asano, S., Kojima, I. (1993) Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes, *The Journal of Clinical Investigation* **92**(3), 1491-1496
172. Houck, K.A., Michalopoulos, G.K. (1989) Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta, *Journal of Cellular Physiology* **141**(3), 503-509
173. Kalthoff, S. (2010) Dissertation: Molekulare Mechanismen der Umwelt-Geninteraktionen in der mukosalen Barriere des Gastrointestinaltraktes, Leibniz Universität Hannover
174. Scholzen, T., Gerdes, J. (2000) The Ki-67 Protein: From the known and the unknown, *Journal of Cellular Physiology* **182**(3), 311-322
175. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *PNAS* **88**(16), 7276-7280
176. TaqMan[®] Gene Expression Assays for Validating Hits From Fluorescent Microarrays, In: White Paper TaqMan[®] Gene Expression Assays (2006)
177. Liu, Y., Binz, J., Numerick M.J., Dennis, S., Luo, G., Desai, B., Mackenzie, K.I., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., Goodwin, B., Jones, S.A. (2003) Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis, *The Journal of Clinical Investigation* **112**(11), 1678-1687
178. Jung, D., Inagaki, T., Gerard, R.D., Dawson, P.A., Kliewer S.A., Mangelsdorf, D.J., Moschetta, A. (2007) FXR agonist and FGF15 reduce fecal bile acid excretion in a mouse model of bile acid malabsorption, *Journal of Lipid Research* **48**(12), 2693-2700
179. Modica, S. Petruzelli, M., Bellafante, E., Murzilli, S., Salvatore, L., Celli, N., Di Tullio, G., Palasciano, G., Moustafa, T. Halilbasic, E., Trauner, M., Moschetta, A. (2012) Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis, *Gastroenterology* **142**(2), 355-365

180. Stieger, B., Geier, A. (2011) Genetic variations of bile salt transporters as predisposing factors for drug-induced cholestasis, intrahepatic cholestasis of pregnancy and therapeutic response of viral hepatitis, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* **7**(4), 411-425
181. Trauner, M., Boyer, J.L. (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation, *Physiological Reviews* **83**(2), 633-671
182. Osawa, Y., Hoshi, M., Yasuda, I., Saibara, T., Moriwaki, H., Kozawa, O. (2013) Tumor Necrosis Factor- α Promotes Cholestasis-Induced Liver Fibrosis in the Mouse through Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Production in Hepatic Stellate Cells, *PLOS One* **8**(6), 1-10
183. Renton, K.W. (2001) Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation, *Pharmacology & Therapeutics* **92**(2-3), 147-163
184. Teng, S., Piquette-Miller, M. (2005) The Involvement of the Pregnane X Receptor in Hepatic Gene Regulation during inflammation in Mice, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**(2), 841-848
185. Nakai, K., Tanaka, H., Hanada, K., Ogata, H., Suzuki, F., Kumada, H., Miyajima, A., Ishida, S., Sunouchi, M., Habano, W., Kamikawa Y., Kubota, K., Kita, J., Ozawa, S., Ohno, Y. (2008) Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug-transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients, *Drug Metabolism and Disposition* **36**(9), 1786-1793
186. Richardson, T.A., Sherman, M., Kalma, D., Morgan, E.T. (2006) Expression of UDP glucuronosyltransferase isoform mRNAs during inflammation and infection in mouse liver and kidney, *Drug Metabolism and Disposition* **34**(3), 351-353
187. Congiu, M., Mashford, M.L., Slavin, J.L., Desmond, P.V. (2002) UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease, *Drug Metabolism and Disposition* **30**(2), 129-134
188. Bonzo, J.A. (2007) Dissertation Xenobiotic regulation of Phase I and Phase II metabolism enzymes: beyond the Ah receptor Paradigm, UC San Diego
189. Jaeschke, H. (2011) Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts, *Gastroenterology* **26** (Suppl 1), 173-179
190. Paumgartner, G. Beuers, U. (2002) Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited, *Journal of Hepatology* **36**(3), 525-531
191. Paumgartner, G. (2010) Biliary physiology and disease: reflections of a physician-scientist, *Journal of Hepatology* **51**(4), 1095-1106
192. Trauner, M., Graziadei, I.W. (1999) Review article: mechanisms of action and therapeutic application of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **13**(8), 979-996
193. Goulis, J., Leandro, G., Burroughs, A.K. (1999) Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis, *Lancet* **354**(9184), 1053-1060
194. Firrincieli, D., Zuniga, S., Poupon, R., Housset, C., Chignard, N. (2011) Bile Salts and nuclear receptors in biliary epithelial cell pathophysiology, *Digestive diseases* **29**(1), 52-57
195. Stedman, C., Liddle, C., Coulter, S., Sonoda, J., Alvarez, J.G., Evans, R.M., Downes, M. (2006) Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis, *PNAS* **103**(30), 11323-11328

196. Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Weiglein, A.H., Lammert, F., Marschall, H.U., Tsybrovskyy, O., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner, M. (2002) Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles, *Gastroenterology* **123**(4), 1238-1251
197. Fickert, P., Wagner, M., Marschall, H.U., Fuchsbichler, A., Zollner, G., Tsybrovskyy, O., Zatloukal, K., Lui, J., Waalkes, M.P., Cover, C., Denk, H., Hofmann, A.F., Jaeschke, H., Trauner, M. (2006) 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice, *Gastroenterology* **130**(2), 465-481
198. Fickert, P., Pollheimer, M.J., Silbert, D., Moustafa, T., Halilbasic, E., Krones, E., Durchschein, F., Thüringer, A., Zollner, G., Denk, H., Trauner, M. (2013) Differential effects of norUDCA and UDCA in obstructive cholestasis in mice, *Journal of Hepatology* **58**(6), 1201-1208
199. Trottier, J., El Hussein, D., Perreault, M., Pâquet, S., caron, P., Bourassa, S., Verreault, M., Inaba, T.T., Poirier, G.G., Bélanger, A., Guillemette, C., Trauner, M., Barbier, O. (2010) The human UGT1A3 enzyme conjugates norursodeoxycholic acid into a C23-ester glucuronide in the liver, *The Journal of Biological Chemistry* **285**(2), 1113-1121
200. Mason, A., Luketic, V., Lindor, K., Hirschfield, G., Gordon, S., Mayo, M., Kowdley, K., Parés, A., Trauner, M., Castelloe, E., Sciacca, C., Jones, T.B., Böhm, O., Shapiro, D. (2010) Farnesoid-X-receptor agonists: a new class of drugs for the treatment of PBC? An international study evaluating the addition of INT-747 to ursodeoxycholic acid, *Journal of Hepatology* **52**(Suppl. 1), 1-2
201. Kowdley, K., Jones, D., Luketic, V., Chapman, R., Burroughs, A., Hirschfield, G., Poupon, R., Schramm, C., Vincent, C., Rust, C., Parés, A., Mason, A., Sciacca, C., Beecher-Jones, T., Böhm, O., Castelloe, E., Pruzanski, M., Shapiro, D., OCA PBC Study Group (2011) An international study evaluating the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid as monotherapy in PBC, *Journal of Hepatology* **54**(Suppl.), 13
202. Silveira, M.G., Lindor, K.D. (2014) Obeticholic acid and budesonide for the treatment of primary biliary cirrhosis, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **15**(3), 365-372
203. Ozeki, J., Uno, S., Ogura, M., Choi, M., Maeda, T., Sakurai, K., Matsuo, S., Amano, S., Nebert, D.W., Makishima, M. (2011) Aryl hydrocarbon receptor ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances liver damage in bile duct-ligated mice, *Toxicology* **280**(1-2), 10-17
204. Adam, R., Marin-Hargreaves, G., Azoulay, D., Castaing, D., Meriggi, F., Bismuth, H., Repeat hepatectomy for primary liver cancer, in Holzheimer, R.G., Mannick, J.A. (Ed.) (2001) Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-oriented, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München
205. Monshouwer, M., Witkamp, R.F., Nujmeijer, S.M., Van Amsterdam, J.G., Van Miert, A.S. (1996) Suppression of cytochrome P450- and UDP glucuronosyl transferase-dependent enzyme activities by proinflammatory cytokines and possible role of nitric oxide in primary cultures of pig hepatocytes, *Toxicology and Applied Pharmacology* **137**(2), 237-244
206. Strasser, S.I., Mashford, M.L., Desmond, P.V. (1998) Regulation of uridine diphosphate glucuronosyltransferase during the acute-phase response, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **13**(1), 88-94

207. Tian, H., Ou, J., Strom, S.C., Venkataramanan, R. (2005) Activity and Expression of Various Isoforms of Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase are differentially regulated during Hepatic Regeneration in Rats, *Pharmaceutical Research* **22**(12), 2007-2015
208. Tian, H. (2005) The drug metabolizing ability is differentially altered during hepatic regeneration in rats – *in vitro* and *in vivo* assessments, Chapter 4: Activity and Expression of various isoforms of Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) are differentially altered during hepatic regeneration in rats, 88- 117
209. Catania, V.A., Luquita, M.G., Sánchez Pozzi, E.J., Mottino, A.D. (1998) Enhancement of intestinal UDP-glucuronosyltransferase activity in partially hepatectomized rats, *Biochimica et Biophysica Acta* **1380**(3), 345-353
210. Iversen, P.L., Liu, Z., Franklin, M.R. (1985) Selective changes in cytochrome P-450 and UDP-glucuronosyltransferase subpopulations following partial hepatectomy in rats, *Toxicology and Applied Pharmacology* **78**(1),10-18
211. Pellizzer, A.M., Smid, S.A., Strasser, S.I., Lee, C.S., Mashford, M.L., Desmond, P.V. (1996) UDP-glucuronosyltransferase in the regenerating rat liver, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **11**(12), 1130-1136
212. Zakko, W.F., Green, R.M., Gollan, J.L., Berg, C.L. (1996) Hepatic regeneration is associated with preservation of microsomal glucuronidation, *Journal of Hepatology* **24**(5), 1250-1255
213. Csanaky, I.L., Aleksunes, L.M., Tanaka, Y., Klaassen, C.D. (2009) Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **297**(3), G419-G433
214. Zou, Y., Bao, Q., Kumar, S., Hu, M., Wang, G.Y., Dai, G. (2012) Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration, *PLOS ONE* **7**(2): e30675206
215. Braseamle, D.L. (2006) A metabolic push to proliferate, *Science* **313**(5793), 1581-1582
216. Lee, S.-J., Zhang, J.,Choi, A.M.K., Kim, H.P. (2013) Mitochondrial Dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013** (2013), ID 327167
217. Walldorf, J., Hillebrandt, C., Aurich, H., Stock, P., Hempel, M., Ebensing, S., Feig, W.E., Seufferlein, T., Dollinger, M.M., Christ, B. (2010) Propranolol impairs liver regeneration after partial hepatectomy in C57Bl/6-mice by transient attenuation of hepatic lipid accumulation and increased apoptosis, *Scandinavian Journal of Gastroenterology***45**(4), 468-476
218. Yamauchi, H., Uetsuka, K., Okada, T., Nakayama, H., Doi, K. (2003) Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice, *Experimental and Toxicologic Pathology* **54**(4), 281-286
219. Newberry, E.P., Kennedy, S.M., Xie, Y., Luo, J., Stanley, S.E., Semenkovich, C.F, Crooke, R.M., Graham, M.J., Davidson, N.O. (2008) Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models, *Journal of Hepatology* **48**(4), 1097-1105
220. Picard, C., Lambotte, L. Starkel, P., Sempoux, C., Saliez, A., Van den Berge, V., Horsmans, Y. (2002) Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats, *Journal of Hepatology* **36**(5), 645-652

221. Shin, S.M., Yang, J.H., Ki, S.H. (2013) Role of Nrf2-ARE Pathway in Liver Disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013 (763257)
222. Dayoub, R., Vogel, A., Schuett, J., Lupke, M., Speiker, S.M., Ketter, N., Hildt, E., Melter, M., Weiss, T.S. (2013) Nrf2 activates augmenter of liver regeneration (ALR) via antioxidant response elements and links oxidative stress to liver regeneration, *Molecular Medicine* **19**(1), 237-244
223. Beyer, T.A., Xu, W., Teupser, D., auf dem Keller, U., Bugnon, P., Hildt, E., Thiery, J., Kan, Y.W., Werner, S. (2008) Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance, *The EMBO Journal* **27**(1), 212-223
224. Mitchell, K.A., Lockhart, C.A., Huang, G., Elferink, C.J. (2006) Sustained Aryl hydrocarbon receptor activity attenuates liver regeneration, *Molecular Pharmacology* **70**(1), 163-170
225. Wüstefeld, T., Rakemann, T., Kubicka, S., Manns, M.P., Trautwein, C. (2000) Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice, *Journal of Hepatology* **32**(3), 514-522
226. Wüstefeld, T. (2002) Dissertation „Molekulare Analyse der IL-6/gp130-abhängigen Signalwege während der Leberregeneration, Universität Hannover
227. Wüstefeld, T., Klein, C., Streetz, K.L., Betz, U., Buer, J., Manns, C.P., Müller, W., Trautwein, C. (2003) IL6/gp130-dependent pathways are protective during liver regeneration, *Journal of Hepatology* **38**(1), 218-229
228. Freimuth, J. (2009) Dissertation: Molecular Analysis of the Role of Caspase-8 during liver regeneration and tumorigenesis, RWTH Aachen
229. Mikura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., Kato, A., Yoshitomi, H., Nozawa, S., Furukawa, K., Mitsuhashi, N., Sawada, S., Takeuchi, D., Ambiru, S., Miyazaki, M. (2006) Circulating cytokines, chemokines, and stress hormones are increased in patients with organ dysfunction following liver resection, *The Journal of Surgical Research* **133**(2), 102-112
230. Fujita, J., Marino, M.W., Wada, H., Jungbluth, A.A., Mackrell, P.J., Rivadeneira, D.E., Stapleton, P.P., Daly, J.M. (2001) Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice, *Surgery* **129**(1), 48-54
231. Cai, S.-Y., Boyer, J.L. (2006) FXR: a target for cholestatic syndromes?, *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **10**(3), 409-421
232. Liu, N., Meng, Z., Lou, G., Zhou, W., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, L., Liu, X., Yen, Y., Lai, L., Forman, B.M., Xu, Z., Xu, R., Huang, W. (2012) Hepatocarcinogenesis in FXR^{-/-} mice mimics human HCC progression that operates through HNF1 α regulation of FXR expression, *Molecular Endocrinology* **26**(5), 775-785
233. Meng, Z., Wang, X., Huang, W. (2012) Roles of the primary bile acid receptor FXR in liver repair and tumorigenesis, *Cancer Research* **72**(8), Suppl. 1, 4424
234. Borude, P., Edwards, G., Walesky, C., Li, F., Ma, X., Kong, B., Guo, G.L., Apte, U. (2012) Hepatocyte-specific deletion of farnesoid X receptor delays but does not inhibit liver regeneration after partial hepatectomy in mice, *Journal of Hepatology* **56**(6), 2344-2352
235. Chen, W.D., Wang, Y.D., Zhang, L., Shiah, S., Wang, M., Yang, F., Yu, D., Forman, B.M., Huang, W. (2010) Farnesoid X receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription, *Journal of Hepatology* **51**(3), 953-962

-
236. Wang, X., Kiyokawa, H., Dennewitz, M.B., Costa, R.H. (2002) The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration, *PNAS* **99**(26), 16881-16886
237. Marlowe, J. L., Puga, A. (2005) Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity and tumorigenesis, *Journal of Cellular Biochemistry* **96**(6), 1174-1184
238. Puga, A., Xia, Y., Elferink, C. (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation, *Chemico-Biological Interactions* **141**(1-2), 117-130
239. Huang, G., Elferink, C.J. (2005) Multiple Mechanisms Are Involved in Ah Receptor-Mediated Cell Cycle Arrest, *Molecular Pharmacology* **67**(1), 88-96

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Dreidimensionale Struktur eines Leberazinus und Aufbau eines Lebersinusoiden (Ausschnitt)	2
Abb. 2: Gliederung der Leber	3
Abb. 3: Lokalisation und Funktion der UDP-Glukuonosyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum (ER)	4
Abb. 4: Genetische Organisation des humanen <i>UGT1A</i> -Lokus, schematische Darstellung der Transkription des <i>UGT1A4</i> -Gens	5
Abb. 5: Phylogenetischer Baum der verschiedenen UGT-Isoenzyme	6
Abb. 6: Relative mRNA-Expressionslevel der humanen <i>UGT1A</i> - (A) und <i>UGT2B</i> -Isoformen (B) in der humanen Leber sowie im humanen Dünndarm und Kolon	8
Abb. 7: Negative und positive Feedback-Regulation der für die Kontrolle der Gallensäurebiosynthese verantwortlichen Schlüsselenzyme	11
Abb. 8: Graphische Darstellung der 5'→3'-DNA-Sequenz des <i>UGT1A3</i> -Gens sowie relative Positionen der SNPs und der xenobiotischen Response Elemente (XRE)	13
Abb. 9: Transkriptionelle <i>UGT1A</i> -Regulation durch FXR, AhR und Nrf2	16
Abb. 10: Phänotyp-Analyse in Assoziation mit der <i>Ugt1</i> -Mutation	18
Abb. 11: Umwandlung von Cholesterol über den klassischen bzw. den alternativen („sauren“) Weg	20
Abb. 12: Enterohepatische Zirkulation der Gallensäuren über Transportproteine in Hepatozyten, Ileozyten (ileale Enterozyten), Kolonozyten und proximale Tubuluszellen der Niere	21
Abb. 13: Schematische Darstellung der an der Leberregeneration beteiligten Faktoren	27
Abb. 14: Schematische Darstellung des humanen <i>UGT1A</i> -Lokus und der hergestellten BAC-Konstrukte, die die Gene <i>UGT1A1</i> , <i>UGT1A3</i> , <i>UGT1A4</i> , <i>UGT1A5</i> , <i>UGT1A6</i> , <i>UGT1A7</i> und <i>UGT1A9</i> enthielten	31
Abb. 15: Ligatur des Gallenganges	39
Abb. 16: Leberteileresektion (partielle Hepatektomie) des linken lateralen und des medianen Leberlappens	40
Abb. 17: 2/3 Hepatektomie	41

Abb. 18: Taqman [®] Exonuklease Assay	55
Abb. 19: Serumtransaminaseaktivitäten nach GW4064-Behandlung in <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen	58
Abb. 20: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach GW4064-Behandlung und Kontrollen (DMSO/ Corn Oil).	59
Abb. 21: GW4064-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion in der Leber von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen	60
Abb. 22: GW4064-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion in der Leber von humanisierten transgenen <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen	60
Abb. 23: GW4064-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion im Jejunum von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen	62
Abb. 24: GW4064-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion im Kolon von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen	62
Abb. 25: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α nach GW4064-Behandlung in humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen	63
Abb. 26: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR nach GW4064-Behandlung in humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen	63
Abb. 27: Makroskopische Erscheinung der Leber nach Sham Laparotomie (C) bzw. BDL (F) sowie Veränderungen der Haut bei Cholestase (D+E) im Vergleich zu Sham-operierten Kontrollen (A+C)	64
Abb. 28: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse bei Cholestase	64
Abb. 29: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse bei Cholestase	66
Abb. 30: Leberhistologie (Sirius-Rot), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse bei Cholestase	66
Abb. 31: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse bei Cholestase	67
Abb. 32: Leberhistologie (Sirius-Rot), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse bei Cholestase	67
Abb. 33: Cholestase-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion in der Leber von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen	69
Abb. 34: Cholestase-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion in der Leber von humanisierten transgenen <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen	69
Abb. 35: Cholestase-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion im Jejunum von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen	71

Abb. 36: Cholestase-vermittelte <i>UGT1A</i> -mRNA-Induktion im Kolon von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen	71
Abb. 37: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen bei Cholestase (BDL 5d)	72
Abb. 38: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen bei Cholestase (BDL 5d)	73
Abb. 39: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach GW4064-Behandlung während der Cholestase	74
Abb. 40: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	76
Abb. 41: Leberhistologie (Sirius-Rot), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	76
Abb. 42: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	77
Abb. 43: Leberhistologie (Sirius-Rot), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	77
Abb. 44: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	78
Abb. 45: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	79
Abb. 46: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Jejunum humanisierter <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	80
Abb. 47: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Kolon humanisierter <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	81
Abb. 48: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	82

Abb. 49: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen nach GW4064-Behandlung bei Cholestase	82
Abb. 50: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	84
Abb. 51: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	85
Abb. 52: Leberhistologie (Sirius-Rot), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	85
Abb. 53: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	86
Abb. 54: Leberhistologie (Sirius-Rot), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	86
Abb. 55: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	88
Abb. 56: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	88
Abb. 57: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Jejunum von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	89
Abb. 58: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Kolon von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	90
Abb. 59: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	91
Abb. 60: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung bei Cholestase	91
Abb. 61: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 6h-120h)	93

Abb. 62: Prozentualer Anteil Ki-67-positiver Nuklei in der Leber <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx)	94
Abb. 63: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach Sham-Operation (A+G) bzw. partieller Hepatektomie (6h/24h/48h/72h/120h; WT: B-F, SNP: H-M)	95
Abb. 64: Ki-67-Immunhistochemie, <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach Sham-Operation (A+G) bzw. partieller Hepatektomie (6h/24h/48h/72h/120h; WT: B-F, SNP: H-M)	96
Abb. 65: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäusen während der Leberregeneration nach PHx	97
Abb. 66: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen während der Leberregeneration nach PHx	98
Abb. 67: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Jejunum von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen während der Leberregeneration nach PHx	99
Abb. 68: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Kolon von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen während der Leberregeneration nach PHx	100
Abb. 69: Hepatische mRNA-Expression der Cytokine IL-6 und TNF- α in humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx6h-72h)	101
Abb. 70: Hepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR in humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx6h-72h)	102
Abb. 71: Extrahepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR im Jejunum humanisierter transgener <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx6h-72h)	102
Abb. 72: Extrahepatische mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AhR, Nrf2 und FXR im Kolon humanisierter transgener <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen nach partieller Hepatektomie (PHx6h-72h)	103

Abb. 73: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 72h) und GW4064-Behandlung	104
Abb. 74: Prozentualer Anteil Ki-67-positiver Nuklei in der Leber <i>tgUGT1A</i> - <i>WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx) und GW4064-Behandlung	105
Abb. 75: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(A) bzw. GW4064-Behandlung (B)	106
Abb. 76: Ki-67-Immunhistochemie, <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(C) bzw. GW4064-Behandlung (D)	106
Abb. 77: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(E) bzw. GW4064-Behandlung (F)	107
Abb. 78: Ki-67-Immunhistochemie, <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(G) bzw. GW4064-Behandlung (H)	107
Abb. 79: Regulation der mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäusen nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration	108
Abb. 80: Regulation der mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen nach GW4064-Behandlung während der Leberregeneration	108
Abb. 81: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Jejunum von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen nach GW4064- Behandlung während der Leberregeneration	109
Abb. 82: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Kolon von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen nach GW4064- Behandlung während der Leberregeneration	110
Abb. 83: Serumtransaminaseaktivität und Bilirubinlevel <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx 72h) und TCDD- Behandlung	111
Abb. 84: Prozentualer Anteil Ki-67-positiver Nuklei in der Leber <i>tgUGT1A</i> - <i>WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäuse nach partieller Hepatektomie (PHx) und TCDD-Behandlung	112

Abb. 85: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(A) bzw. TCDD-Behandlung (B)	113
Abb. 86: Ki-67-Immunhistochemie, <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(C) bzw. TCDD-Behandlung (D)	113
Abb. 87: Leberhistologie (HE), <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(E) bzw. TCDD-Behandlung (F)	114
Abb. 88: Ki-67-Immunhistochemie, <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäuse nach Hepatektomie (PHx72h) und DMSO/Corn Oil-(G) bzw. TCDD-Behandlung (H)	114
Abb. 89: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration	115
Abb. 90: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression in der Leber von humanisierten <i>tgUGT1A-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration	115
Abb. 91: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Jejunum von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration	117
Abb. 92: Regulation der <i>UGT1A</i> -mRNA-Expression im Kolon von humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>-SNP</i> -Mäusen nach TCDD-Behandlung während der Leberregeneration	117

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Liste verwendeter Oligonukleotide für Amplifizierung	32
Tab. 2: Liste verwendeter Primer und Sonden für die TaqMan-PCR	32
Tab. 3: Liste verwendeter Enzyme	33
Tab. 4: Liste verwendeter Antikörper	33
Tab. 5: Liste der verwendeten Substanzen für die <i>UGT1A</i> -Induktion	34
Tab. 6: Protokoll des Gewebeeinfiltrationsautomaten TP1020	46
Tab. 7: Protokoll der HE-Färbung im Färbeautomat	47
Tab. 8: Protokoll der Sirius-Rot-Färbung	48
Tab. 9: Protokoll der Ki67-Immunhistochemie	50
Tab. 10: Parameter des <i>UGT1A3</i> -PCR-Programms	52
Tab. 11: Reaktionsbedingungen der Taqman-PCR	56

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: **Anja Winkler**

Geburtsdatum: 22.04.1983

Geburtsort: Nordhausen

Familienstand: ledig

Adresse: Röttgener Str. 127, 53127 Bonn

Telefon: 0228 / 38766232

E-Mail: anja.winkler@ukb.uni-bonn.de

SCHULBILDUNG

1989-1993	POS Friedrich Engels / Grundschule „Am Frauenberg“, Nordhausen
1993-1995	Herder-Gymnasium Nordhausen
1995-1999	Robert-Koch-Gymnasium Clausthal-Zellerfeld
1999-2002	Otto-Hahn-Gymnasium Gifhorn, Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2002 – 05/2006	Studium der Biologie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Dipl.-Biologin
07/2008 – 06/2009	Diplomarbeit in der Klinik für Immunologie und Rheumatologie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Prof. Dr. med. Torsten Witte „Assoziationsstudie von Polymorphismen und Allelen im ILT6-Gen mit SLE und Sjögren-Syndrom“

AKADEMISCHE TÄTIGKEITEN

- 11/09- 12/13 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der
Medizinischen Hochschule Hannover
- 01/14- Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik und
Poliklinik I des Universitätsklinikums Bonn

VERÖFFENTLICHUNGEN

PAPER:

- Kalthoff, S., Winkler, A., Freiberg, N., Manns, M.P., Strassburg, C.P. (2013) Gender matters: estrogen receptor alpha (ER α) and histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 control the gender-specific transcriptional regulation of human *uridine diphosphate glucuronosyltransferase genes (UGT1A)*, *Journal of Hepatology* **59**(4), 797-804

ABSTRACTS:

- A Winkler, S Kalthoff, N Freiberg, MP Manns, CP Strassburg
FXR- und Gallengangsligatur-vermittelte transkriptionelle Regulation hepatischer und extrahepatischer Glukuronidierung im humanisierten *UGT1A*-Mausmodell , Heft 8/2011 der Zeitschrift für Gastroenterologie
- A Winkler, S Kalthoff , N Freiberg, MP Manns, CP Strassburg
Regulation der Glukuronidierung bei Cholestase (Gallengangsligatur) und durch FXR-Agonisten im humanisierten transgenen *UGT1A*-Mausmodell, Heft 1/2012 der Zeitschrift für Gastroenterologie

VORTRÄGE:

- Winkler A, Kalthoff S, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP
Regulation der Glukuronidierung bei Cholestase (Gallengangsligatur) und durch FXR-Agonisten im humanisierten transgenen *UGT1A*-Mausmodell (GASL 2012)

- Winkler A, Kalthoff S, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP
Differentialle und gewebespezifische Regulation hepatischer und extrahepatischer Glukuronidierung nach 2/3 Hepatektomie im humanisierten *UGT1A*-Mausmodell (DGVS 2012)

POSTER:

- Winkler A, Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP
Cholestasis leads to the differential and tissue specific activation of human *UDP-glucuronosyltransferase 1A* genes in bile duct ligated *tgUGT1A* mice
AASLD 2010
- A Winkler, S Kalthoff, N Freiberg, MP Manns, CP Strassburg
FXR-und Gallengangsligatur-vermittelte transkriptionelle Regulation hepatischer und extrahepatischer Glukuronidierung im humanisierten *UGT1A*-Mausmodell
DGVS 2011
- Winkler A, Kalthoff S, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP
Transcriptional Regulation of human *UDP-glucuronosyltransferase 1A* genes in partially hepatectomized or bile duct-ligated *tgUGT1A* mice
AASLD 2011
- Winkler A, Kalthoff S, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP
Differential Regulation of human *UDP-glucuronosyltransferase 1A* genes during liver regeneration in *tgUGT1A* mice
EASL 2012
- Winkler A, Kalthoff S, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP
Transcriptional regulation of hepatic and extrahepatic glucuronidation in *tgUGT1A WT* mice in obstructive cholestasis (BDL) and by FXR agonist GW4064
AASLD 2012
- Winkler A, Kalthoff S, Freiberg, N, Manns, MP, Strassburg CP
The FXR agonist GW4064 increases liver injury leading to an inhibition of the transcriptional activation of *UGT1A* genes in bile duct-ligated *tgUGT1A WT* mice
EASL 2013

- Winkler A, Kalthoff S, Freiberg, N, Manns, MP, Strassburg CP
AhR-mediated regulation of hepatic glucuronidation in obstructive cholestasis (BDL) in a *tgUGT1A* mouse model
AASLD 2013
- Winkler A, Kalthoff S, Strassburg CP
AhR-mediated modulation of hepatic glucuronidation in bile duct-ligated *tgUGT1A* mice
EASL 2014

DANKSAGUNG

Der Weg war das Ziel.

Doch ohne die vielen Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben, hätte ich die Freude über die Verleihung meines Doktorgrades nicht erleben können. Ich möchte daher die Gelegenheit nutzen, um meinen tiefen Dank zum Ausdruck zu bringen.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Strassburg für die Auswahl des interessanten Dissertationsthemas, seine Betreuung in den letzten Jahren und die Möglichkeit auch zukünftig als Mitglied seiner Arbeitsgruppe spannende Themen bearbeiten zu können.

Ebenso geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Debener für die Übernahme der Korreferenz und des Prüfungsvorsitzes im Rahmen meiner Disputation sowie an Frau Prof. Dr. med. Brigitte Schlegelbeger für die Bereitschaft als Drittprüferin Teil des Prüferkollegiums im Rahmen meiner Disputation zu sein.

Meinen Kolleginnen Sandra Kalthoff und Nicole Freiberg danke ich für ihre Geduld in der Einarbeitungsphase und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Durch viele private Gespräche seid ihr mir inzwischen auch zu lieben Freunden geworden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Förderung meines Projektes im Rahmen des Projektes C3 des Sonderforschungsbereiches 621 „Pathobiologie der intestinalen Mukosa“.

Ebenso danke ich meinen Kollegen und Kolleginnen der Medizinischen Hochschule Hannover, die mir stets Ansprechpartner waren, für ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere Nina Armbrecht für ihre Geduld bei der Vermittlung der histologischen Arbeitstechniken sowie Elena Wiebe und Mathab Taleb Naghs für die Anfertigung der histologischen bzw. immunhistochemischen Färbungen.

Mein Dank gilt ebenfalls den Kollegen aus der Experimentellen Reproduktionsbiologie der MHH, PD Dr. Martina Dorsch, Isabell Wittur und Silke Glowotz, für die Bereitstellung des Anästhesie-Gerätes für die Kleintier-OP.

Ich möchte mich außerdem bei meinem Diplomvater Prof. Dr. med. Torsten Witte sowie bei meiner ehemaligen Kollegin aus der Klinik für Immunologie und Rheumatologie, Frau Katja Kniesch, bedanken, die gewissermaßen den Grundstein für meine weitere wissenschaftliche Laufbahn gelegt haben.

Meinen neuen Kollegen und Kolleginnen am Universitätsklinikum Bonn danke ich für Ihre herzliche Aufnahme sowie die Anregungen und konstruktive Kritik bei der Vorbereitung meines Disputationsvortrages.

Besonderer Dank gilt vor allem meinen Freunden und meiner Familie für ihren emotionalen Rückhalt und ihre Unterstützung während des gesamten Studiums.

Meinem Partner danke ich für seine Geduld und sein Verständnis, das er mir in den letzten Jahren entgegen brachte. Du hast mir sehr viel Kraft, vor allem aber auch die notwendige Ruhe und Zuversicht gegeben.