

UNTERSUCHUNGEN ZUR ZONALEN VERTEILUNG  
DER TRANSPORTER FÜR GALLENSALZE  
UND ORGANISCHE ANIONEN BEI  
EXPERIMENTELLER CHOLESTASE  
IN DER RATTENLEBER

STEPHANIE SCHUMACHER

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung  
des Grades eines **Dr. med. vet.** beim  
Fachbereich Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches  
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen

Betreuer : Prof. Dr. Ernst Petzinger

**und**

der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Betreuer : Dr. Markus G. Donner

**Untersuchungen zur zonalen Verteilung der Transporter  
für Gallensalze und organische Anionen  
bei experimenteller Cholestase in der Rattenleber**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Stephanie Schumacher**  
Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Dekan:**

Prof. Dr. M. Kramer

**Gutachter:**

Prof. Dr. E. Petzinger

Dr. M.G. Donner

Tag der Disputation: 12. Januar 2011

**Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht:**

Donner, M.G., Schumacher, S., Warskulat, U., Häussinger, D. (2006).

Coordinated periportal down-regulation of Bsep and Ntcp in experimental cholestasis with induction of periportal Oatp1a4 and Oatp1b2.

J Hepatology (44, Suppl. 2), S119-S120.

Donner, M.G., Schumacher, S., Warskulat, U., Häussinger, D. (2007).

Periportal down-regulation of Bsep and Mrp2 in experimental obstructive cholestasis is mediated by TNF-alpha and IL1-beta and is associated with periportal inflammation and cytokine secretion.

J Hepatology (46, Suppl. 1), S120-S121.

Donner, M.G., Schumacher, S., Warskulat, U., Heinemann, J., Häussinger, D. (2007).

Obstructive cholestasis induced TNF-alpha and IL-1-mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (293), S1134-S1146.



---

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN .....</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau der Leber.....	1
1.1.1 Mikroskopische Anatomie.....	2
1.1.2 Funktionelle Einheit.....	4
1.1.2.1 Der klassische Leber-Lobulus.....	4
1.1.2.2 Der Azinus nach RAPPAPORT.....	5
1.2 Funktion der Leber .....	6
1.3 Metabolische Heterogenität der Leber.....	7
1.4 Hepatozellulärer Transport von Gallensalzen und organischen Anionen.....	9
1.4.1 Basolaterale Gallensalzaufnahme.....	9
1.4.1.1 Natrium-abhängige Aufnahme von Gallensalzen .....	9
1.4.1.2 Natrium-unabhängige Aufnahme von Gallensalzen .....	10
1.4.2 Basolaterale Aufnahme von organischen Anionen.....	11
1.4.2.1 "Organic-Anion-Transporting-Polypeptid" 1a1 .....	11
1.4.2.2 "Organic-Anion-Transporting-Polypeptid" 1a4 .....	11
1.4.2.3 "Organic-Anion-Transporting-Polypeptid" 1b2 .....	12
1.4.3 Kanalikuläre Gallensalzsekretion.....	13
1.4.4 Kanalikuläre Sekretion von organischen Anionen .....	14
1.4.5 Basolateraler Export von Gallensalzen und organischen Anionen.....	14
1.4.6 Regulation von hepatobiliären Transportern bei Cholestase.....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2 MATERIALIEN.....</b>	<b>18</b>
2.1 Chemikalien.....	18
2.2 Puffer .....	18



2.3	Antikörper .....	19
2.3.1	Primärantikörper.....	19
2.3.2	Sekundärantikörper.....	20
2.4	Größen- und Molekulargewichtsmarker .....	21
2.5	Homogenisierungspuffer .....	21
2.6	Lösungen zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	21
2.7	Lösungen für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und den Western Blot.....	22
2.8	Primer für die Real Time-PCR.....	22
2.9	Fotoarbeiten und Bildverarbeitung .....	23
2.10	Sonstige Materialien.....	23
2.11	Geräte.....	23
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>24</b>
3.1	RNA-Präparation und Real Time-PCR.....	24
3.1.1	Aufbereitung der Proben.....	24
3.1.2	RNA-Isolierung.....	24
3.1.3	Konzentrationsmessung .....	25
3.1.4	Reverse Transkription.....	26
3.1.5	Real Time-PCR.....	27
3.2	Proteinbiochemische Verfahren .....	29
3.2.1	Isolierung von Gesamt-Membranfraktionen aus Lebergewebe.....	29
3.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	29
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	30
3.2.4	Immunoblot-Analyse (Western Blot) .....	31
3.2.4.1	Proteintransfer.....	31
3.2.4.2	Detektion durch Chemolumineszenz .....	32
3.2.4.3	Densitometrische Auswertung .....	32
3.3	Histologische Methoden .....	33
3.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz.....	33
3.3.1.1	Herstellung von Gefrierschnitten.....	33

---

3.3.1.2	Fixierung.....	33
3.3.1.3	Indirekte Immunfluoreszenz .....	33
3.3.1.4	Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	34
3.3.1.5	Densitometrische Analyse.....	34
3.4	Tierversuche.....	35
3.4.1	Versuchstiere und Haltung.....	35
3.4.1.1	Gallengangsligatur .....	35
3.4.1.1.1	Operation .....	35
3.4.1.1.2	Zytokininhibition .....	36
3.4.1.1.3	Organentnahme .....	36
3.4.1.2	Lipopolysaccharid-Gabe.....	36
3.4.1.2.1	Dosierung und Injektion .....	36
3.4.1.2.2	Organentnahme .....	36
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>37</b>
4.1	Real Time-PCR .....	37
4.1.1	mRNA-Expression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase ..	37
4.1.2	mRNA-Expression von hepatobiliären Transportern nach Lipopolysaccharid-Gabe	39
4.1.3	mRNA-Expression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$ oder IL-1 $\beta$ .....	40
4.2	Western Blot.....	42
4.2.1	Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase ..	42
4.2.2	Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach Lipopolysaccharid-Gabe...	44
4.2.3	Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$ oder IL-1 $\beta$ .....	46
4.3	Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	48
4.3.1	Zonierte Regulation von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase	48
4.3.1.1	Effekte der Hemmung von TNF- $\alpha$ .....	55
4.3.1.2	Effekte der Hemmung von IL-1 $\beta$ .....	56
4.3.2	Zonierung von hepatobiliären Transportern nach Lipopolysaccharid-Gabe.....	59
4.3.3	Lobuläre Verteilung der proinflammatorischen Reaktionen nach obstruktiver Cholestase und nach Lipopolysaccharid-Gabe .....	65
4.3.3.1	Kupferzellen .....	65
4.3.3.2	Myeloperoxidase-positive Zellen.....	65
4.3.3.3	Interleukin 1 $\beta$ .....	66

<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>67</b>
	Hemmung der periportalen Herabregulation von Bsep durch Inhibition von TNF- $\alpha$ oder IL-1 $\beta$ .	68
	Zonierte Regulation von Ntcp.....	69
	Bedeutung der zonierten Regulation von Oatp1a4 und Oatp1b2 nach obstruktiver Cholestase	70
	Zonale Verteilung von hepatobiliären Transportern nach Lipopolysaccharid-Gabe .....	73
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1** Ultrastruktur des Leberläppchens
- Abb. 2** Der klassische Leber-Lobulus
- Abb. 3** Der Azinus nach RAPAPPORT
- Abb. 4** Lobuläre Expression der Glutaminsynthetase
- Abb. 5** Schematische Darstellung der Expression von hepatobiliären Transportern in der Rattenleber
- Abb. 6** Real Time-PCR Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach obstruktiver Cholestase
- Abb. 7** Real Time-PCR Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach Lipopolysaccharid-Gabe
- Abb. 8** Real Time-PCR-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$
- Abb. 9** Immunoblot-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach obstruktiver Cholestase
- Abb. 10** Immunoblot-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach Lipopolysaccharid-Gabe
- Abb. 11** Immunoblot-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$
- Abb. 12** Lokalisation von Bsep nach obstruktiver Cholestase
- Abb. 13** Lokalisation von Ntcp nach obstruktiver Cholestase
- Abb. 14** Lokalisation von Oatp1a1 nach obstruktiver Cholestase
- Abb. 15** Lokalisation von Oatp1a4 nach obstruktiver Cholestase
- Abb. 16** Lokalisation von Oatp1b2 nach obstruktiver Cholestase
- Abb. 17** Lokalisation von Bsep nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$
- Abb. 18** Quantitative Immunfluoreszenz von Ntcp und von Oatp-Isoformen in der Rattenleber nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$
- Abb. 19** Quantitative Immunfluoreszenz von Bsep nach Lipopolysaccharid-Gabe
- Abb. 20** Quantitative Immunfluoreszenz von Ntcp nach Lipopolysaccharid-Gabe
- Abb. 21** Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a1 nach Lipopolysaccharid-Gabe
- Abb. 22** Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a4 nach Lipopolysaccharid-Gabe
- Abb. 23** Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1b2 nach Lipopolysaccharid-Gabe
- Abb. 24** Lokalisation von Kupfferzellen, neutrophilen Granulozyten und IL-1 $\beta$  nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase und 24 Stunden nach Lipopolysaccharid-Gabe

## Abkürzungen und Symbole

μ	Mikro
°C	Grad Celsius
A., Aa.	Arteria, Arteriae
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Ana	Anakinra
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDL	"Bile Duct Ligation", Gallengangsligatur
cDNA	"complementary DNA", komplementäre DNA
cm	Zentimeter
d	Tag
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DNA	"Desoxyribonucleic acid", Desoxyribonukleinsäure
ds	"double strand", Doppelstrang
E	Extinktion
ECL	"enhanced chemoluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eta	Etanercept
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FCS	"Foetal Calf Serum", Fötales Kälberserum
FXR:RXR	Farnesoid-X-Rezeptor:Retinoid-X-Rezeptor
g	Gravitationskonstante (9,897 m/s <sup>2</sup> )
gr	Gramm
GGL	Gallengangsligatur
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
K	Kontrolle
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht

I	Liter
IF	Immunfluoreszenz
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Molar
min	Minute
mRNA	"messenger"- Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	"Phosphate buffered saline", Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	"Polymerase chain reaction", Polymerasekettenreaktion
PXR	"pregnane-X-receptor"
RNA	"Ribonucleic acid", Ribonukleinsäure
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	"Reverse Transcriptase-Polymerase chain reaction"
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
sec.	Sekunde
sog.	sogenannte
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit 0,05% Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	"Unit", Einheit
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V., Vv.	Vena, Venae
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Leber

Die Leber entwickelt sich als unpaares Bauchhöhlenorgan aus einer entodermalen Epithelknospe des hepatopankreatischen Ringes des Vorderdarms.

Der Aufbau der Leber wird wesentlich durch die Blutgefäße (V. portae, A. hepatica und Vv. hepaticae) und das Gallengangssystem geprägt. Die V. portae transportiert das mit Nährstoffen angereicherte Blut aus Magen und Darm in die Leber. Die A. hepatica hingegen versorgt das Organ mit sauerstoffreichem Blut. Die V. portae und A. hepatica zweigen sich in der Leber bis in die Vv. interlobulares und Aa. interlobulares auf, jeweils eine Vene und eine Arterie bilden gemeinsam mit einem Ast des Gallengangssystems (Ductuli interlobulares biferi) eine Glisson'sche Trias und verlaufen, von Bindegewebe umgeben, im Portalfeld. Bei Fluss durch die Sinusoide erfolgt die Mischung von portalvenösem und arteriellem Blut. Nach dem Stoffaustausch mit den Hepatozyten fließt das Blut von den Sinusoiden in die V. centralis und von dort in die Vv. sublobulares. Das venöse Blut verlässt die Leber über die Vv. hepaticae zur V. cava inferior.

Die kleinste funktionelle Einheit ist das sog. Leberläppchen (Lobulus). Es besteht aus den Sinusoiden und Hepatozyten, die eine Größe von 20 - 30 µm erreichen. Die Hepatozyten machen 60% des Gewebes der Leber aus und sind in Zellbalken organisiert. Die Lobuli werden von einem tierartlich unterschiedlich ausgebildeten Bindegewebe umgeben, welches z.B. beim Schwein besonders stark ausgeprägt ist. Zwischen den Lobuli liegen die größeren Blutgefäße, das Gallengangssystem und Nervenfasern (Dahme und Weiss 2007).

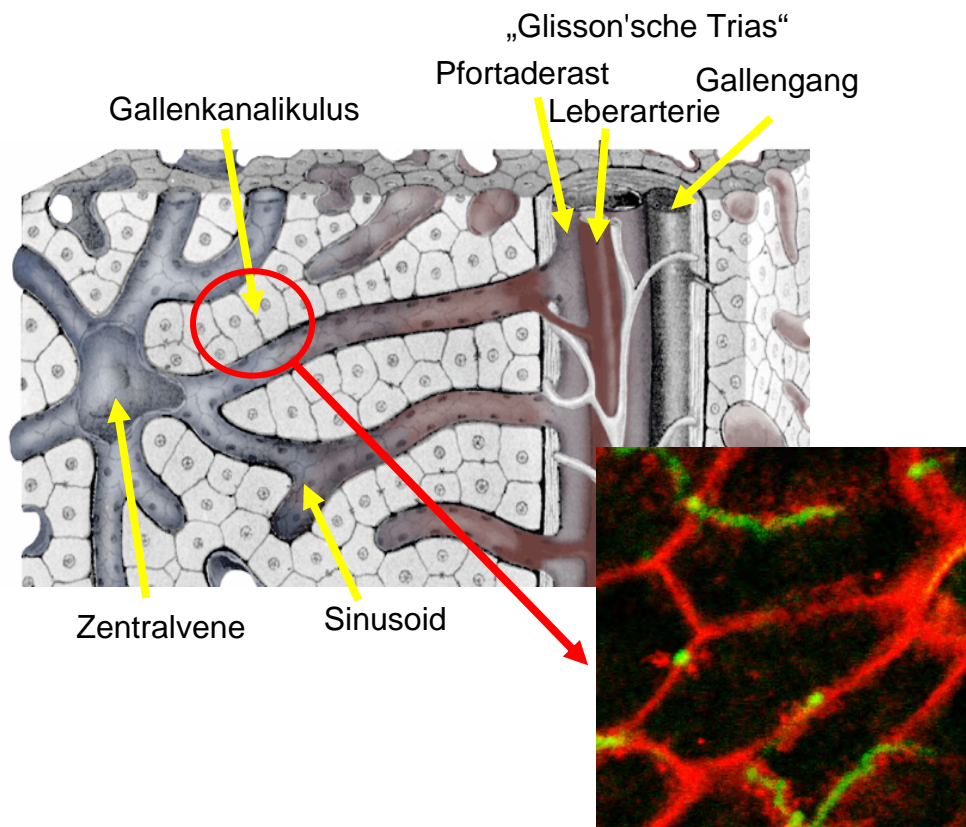


### 1.1.1 Mikroskopische Anatomie

Aus den interlobulären Blutgefäßen gehen terminale Arteriolen und Venolen hervor. Diese verlassen das Portalfeld, ziehen außen am Leberläppchen entlang, anastomosieren miteinander, treten in die Läppchen ein und gehen in die Sinusoide über. Die Wandung der Sinusoide wird von Endothelzellen, Kupfferzellen und Ito-Zellen gebildet. Die Endothelzellen befinden sich in einem diskontinuierlichen Zellverband und besitzen zusätzlich eine diskontinuierliche Basalmembran. Aufgrund dieser Anordnung entstehen Zwischenräume, die die Sinusoide mit dem Disse'schen Raum verbinden. Die Kupfferzellen sind Teil des mononukleären Phagozytosesystems. Sie werden im Knochenmark gebildet, liegen den Endothelzellen an und bewegen sich amöboid fort. Die Ito-Zellen, sog. "fat storing cells", weisen eine große Fettvakuole auf, sind reich an Vitamin A und befinden sich im Disse'schen Raum. Bei Leberschädigung verschiedener Ursache kommt es zu einer Proliferation, Migration und zur Umwandlung der Ito-Zellen in Myofibroblasten.

Das intrahepatische Gallengangssystem beginnt mit den Gallenkanälchen (Canaliculi), die keine eigenen Wände besitzen, sondern von den rinnenförmigen Einstülpungen der Hepatozytenmembranen begrenzt werden. Die Kanalikuli münden in die Gallenductuli (Hering'sche Kanäle), welche außerhalb der Lobuli liegen und die Kanalikuli mit den Gallengängen in den Glisson'schen Trias verbinden. Die Gallengänge in den Periportalfeldern vereinigen sich zu größeren intrahepatischen Gängen (Ductus hepaticus sinister und dexter). Das extrahepatische Gallengangssystem besteht aus dem Ductus hepaticus communis, der Gallenblase und dem Ductus cysticus. Der Ductus choledochus mündet auf der Papilla Vateri in das Duodenum. Der Gallenblase (Vesica fellea) ist tierartlich unterschiedlich ausgebildet und fehlt bei mehreren Tierarten (z.B. Pferd und Ratte). Der Ductus cysticus verbindet die Gallenblase mit dem Ductus choledochus.

Am Übergang von den Hering'schen Kanälen zu den Leberzellbalken liegen sog. Ovalzellen, die als Stammzellpopulation dienen. Von hier schieben sich die Hepatozyten im Laufe ihrer Lebensdauer von ca. 300 Tagen von der Peripherie der Lobuli bis zu den Zentralvenen und werden dort apoptotisch (Klinke und Silbernagl 2005).



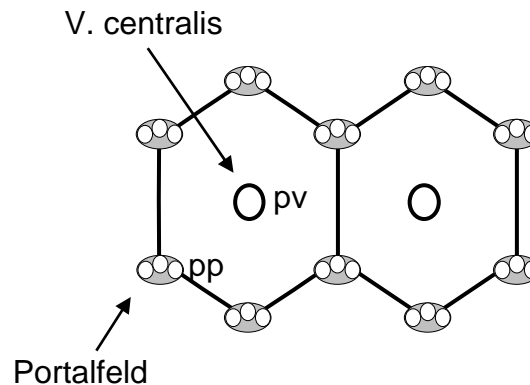
**Abb. 1 Ultrastruktur des Leberläppchens.** Nährstoffreiches Blut aus dem Pfortaderast und sauerstoffreiches Blut aus der Leberarterie fließen durch die Sinusoide in Richtung Zentralvene. Die von den Hepatozyten gebildete Galle wird über die Gallenkanalikululi und über die Hering'sche Kanäle in das Gallenwegssystem abgegeben (nach Klinke und Silbernagl 2005).

## 1.1.2 Funktionelle Einheit

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, die kleinste funktionelle Einheit der Leber zu beschreiben. Das klassische Modell des Leberläppchens orientiert sich an der mikroskopischen Struktur der Leber. Die Beschreibung des Leber-Azinus nach Rappaport berücksichtigt zusätzlich funktionelle Aspekte.

### 1.1.2.1 Der klassische Leber-Lobulus

Die charakteristische Struktur des Leberläppchens wird aus drei Bereichen gebildet: den Portalfeldern mit den Glisson'schen Trias, den radiär auf die Zentralvene zulaufenden Zellbalken mit den dazwischen liegenden Sinusoiden und der V. centralis. Jeder im idealisierten histologischen Schnitt hexagonale Lobulus wird an seinen sechs Ecken von Portalfeldern begrenzt und besitzt einen Durchmesser von ca. 1,5 bis 2 mm. Der Bereich in unmittelbarer Nähe der Zentralvene wird als perivenös (pv) bzw. perizentral bezeichnet, der die Portalfelder umgebende Bereich als periportal (pp).

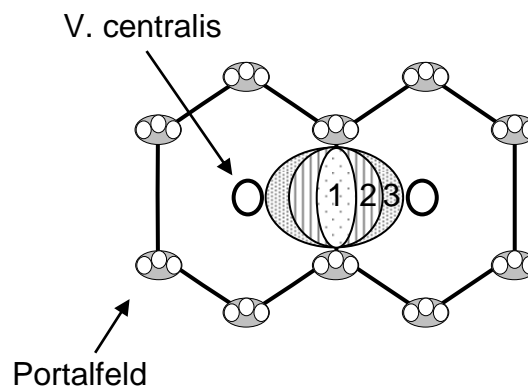


**Abb. 2 Der klassische Leber-Lobulus.** Die V. centralis bildet das Zentrum der Einheit. Die Portalfelder mit den Glisson'schen Trias sind radiär um die Zentralvene angeordnet (pv, perivenös; pp, periportal).

### 1.1.2.2 Der Azinus nach RAPPAPORT

Die Zonierung des Leberazinus nach RAPPAPORT richtet sich am Fluss der Galle aus und hebt die Funktion des Organs als exokrine Drüse und zentrales Stoffwechselorgan hervor.

Das Zentrum des Leberazinus wird hierbei von dem zwischen zwei Periportalfeldern liegenden Bereich gebildet. Die unmittelbar an diesen Bezirk angrenzenden Leberzellen werden der peripherlobulären Zone (Zone 1) zugeordnet, erhalten das nährstoff- und sauerstoffreiche Blut und bilden die peripherlobuläre Zone des Azinus. Die nachgeordnet versorgten Leberzellen liegen im Bereich der Zentralvene und gehören somit der periazinären Zone (Zone 3) an. Die zwischen diesen beiden Bereichen liegenden Hepatozyten werden der Zone 2 zugeordnet (Dahme und Weiss 2007).



**Abb. 3 Azinus nach RAPPAPORT.** Die sauerstoff- und nährstoffreiche Region zwischen den Periportalfeldern wird als Zone 1 (peripherlobulär) bezeichnet. Der Bereich in unmittelbarer Nähe der Zentralvene wird als Zone 3 (periazinär) bezeichnet. Die dazwischen liegenden Hepatozyten werden der Zone 2 zugeordnet.

## 1.2 Funktion der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers. Wichtigste Funktion im Bereich des Kohlenhydratstoffwechsels ist die Konstanzhaltung des Blutglukosespiegels und somit die differentielle Regulation der Glykogensynthese, Glykogenolyse und Glukoneogenese.

Die Leber nimmt Nahrungslipide in Form von Chylomikronen aus der Blutzirkulation auf. Durch Synthese und Sekretion von Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL) werden extrahepatische Gewebe mit hepatisch synthetisiertem Cholesterin und Triglyceriden versorgt. Des Weiteren ist die Leber das zentrale Organ der Fettsäureoxidation und der Synthese von Phospholipiden. Die metabolische Funktion im Aminosäure- und Proteinstoffwechsel umfasst die Bildung zahlreicher Plasmaproteine (z.B. Albumin und Gerinnungsfaktoren), den Proteinabbau durch autophagische Proteolyse, die Bereitstellung von Glucose aus Aminosäuren, die Detoxifikation von Aminogruppen zu Harnstoff sowie die Glutaminsynthese zur alternativen Detoxifikation von Ammoniak (Häussinger et al. 1985, Häussinger 1985, Häussinger 1986). Eine weitere zentrale Funktion ist die Aufnahme und Metabolisierung von Xenobiotika (Petzinger 1994), d.h. von Substanzen, die sowohl endogenen (z.B. Östradiol, Leukotrien C4), als auch exogenen (z.B. Arzneimittel, Toxine) Ursprungs sind (Petzinger und Geyer 2006). Die Entgiftung lipophiler Substanzen erfolgt durch Monooxygenasen, die v.a. im Läppchenzentrum zu finden sind. Dazu ist eine Biotransformation nötig. In einem ersten Schritt werden den hydrophoben Substanzen enzymatisch durch Monooxygenasen reaktive  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NH}_2$  oder  $\text{COOH}$ - Gruppen angefügt, über die die Stoffe dann im zweiten Schritt u.a. an Glucuronsäure, Acetat, Gluthation, Glycin oder Sulfat gekoppelt werden können. Die so wasserlöslich gemachten Substrate werden anschließend von der Leber z.B. über MDR 1 oder MRP 2 in die Galle abgegeben. Des Weiteren dient die Leber der Klärung (Clearance) partikulärer Substanzen aus dem Blut. Dieses geschieht hauptsächlich mit Hilfe der Kupferzellen, die endogene (Immunkomplexe, Gerinnungsprodukte) oder exogene Partikel (Bakterien) phagozytieren. Die Bildung und Sekretion der

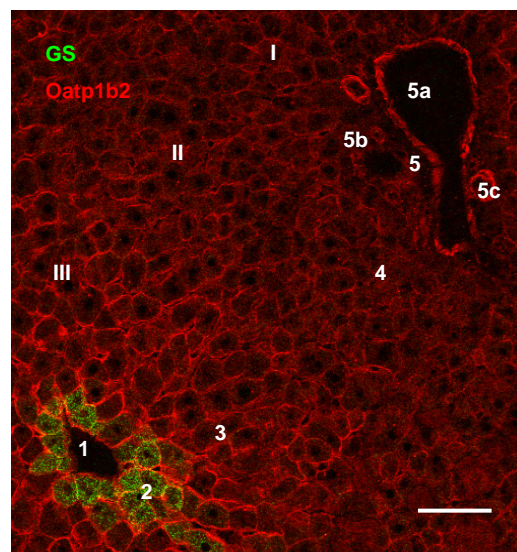
Galle ist eine Voraussetzung für die Detoxifikation einer Vielzahl von exogenen und endogenen Substanzen sowie für die Emulgierung von Nahrungsfetten. Entscheidende Schritte zur Bildung der Galle sind die Synthese von Gallensäuren, Phospholipiden, Cholesterin und Konjugaten sowie der hepatobiliäre Transport gallepflichtiger Substrate (z.B. Bilirubin).

### **1.3 Metabolische Heterogenität der Leber**

Wesentlich für die individuelle enzymatische Ausstattung einer Leberzelle sowie deren Funktion ist die Lage im Lobulus und die Richtung des Blutflusses, der von der Peripherie zur Zentralvene hin erfolgt. Dementsprechend werden zuerst die in der Läppchenperipherie liegenden Hepatozyten mit nährstoff-, sauerstoff- und hormon- (u.a. Insulin, Glukagon) reichem Blut versorgt. Diese Anordnung hat zur Folge, dass man innerhalb eines Lobulus verschiedene metabolische Zonen unterscheiden kann. So liegen in der Läppchenperipherie hohe Enzymaktivitäten für oxidativen Energiestoffwechsel, Zitratzyklus,  $\beta$ -Oxidation, Harnstoffsynthese und Glykogensynthese vor. Zentrolobulär überwiegen Glykolyse, Liponeogenese, Ketogenese und Biotransformationsvorgänge (Singer et al. 1984, Häussinger 1992, Jungermann 1995, Kietzmann und Jungermann 1997). Die enzymatische Ausstattung der Zelle und die metabolische Aktivität in den einzelnen Bereichen der Lobuli sind dabei nicht statisch, sondern passen sich der jeweiligen Ernährungs- und Stoffwechselsituation an.

Als Beispiel für die Zonierung verschiedener Enzyme der Gallensäuresynthese seien hier die Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase und die Sterol-27-Hydroxylase genannt, die beide v.a. in den perizentralen Hepatozyten zu finden sind. Wenn der enterohepatische Kreislauf durch Behandlung mit Colestid unterbrochen wird, wird die Enzymexpression auf die periportalen Hepatozyten ausgedehnt (Twisk et al. 1995). Die Mehrzahl der Konjugationsvorgänge findet in der Zone 3 statt, während die höchste Sulfotransferase-Aktivität in der Zone 1 gemessen wird (el Mouelhi und Kauffman 1986, Pang et al. 1994, Ekberg et al. 1995).

Ein Beispiel für eine ausgeprägte Zonierung ist die Detoxifikation von Ammoniak. Der Hauptanteil des aus dem Proteinabbau hervorgehenden Ammoniaks wird in den Harnstoffzyklus eingeschleust. Die Enzymausstattung des Harnstoffzyklus befindet sich vor allem in den periportalen Hepatozyten. In einem zweiten Schritt erfolgt die Detoxifikation in perizentralen Hepatozyten durch die Glutaminsynthetase. Das Protein befindet sich in den Mitochondrien der Hepatozyten der innersten Zellschichtpopulation in unmittelbarer Nähe der Zentralvene (Häussinger 1983, Gebhardt und Mecke 1983, Gaasbeek-Janzen et al. 1984, Häussinger 1998). Das Enzym kondensiert Glutamat mit Ammoniak. Dieser enzymatische Schritt erfolgt mit hoher Affinität und sorgt für die Detoxifikation von Ammoniak, welches nicht durch die Harnstoffsynthese gebunden wurde.



**Abb. 4 Lobuläre Expression der Glutaminsynthetase.** 1, V. centralis; 2, Glutaminsynthetase-positive Hepatozyten; 3, perivenöse Hepatozyten; 4, periportale Hepatozyten; 5, Periportalfeld; 5a, Ast der V. portae; 5b, Ductuli interlobulares; 5c, Ast der A. hepatica; I, Zone 1; II, Zone 2; III, Zone 3 (GS, Glutaminsynthetase; Oatp1b2, "Organic-Anion-Transporting-Polypeptid" 1b2; Balken, 100 µm).

## 1.4 Hepatozellulärer Transport von Gallensalzen und organischen Anionen

Hepatozyten sind polarisierte Zellen mit einer basolateralen (sinusoidalen) und einer apikalen (kanalikulären) Plasmamembran. Die Aufnahme gallepflichtiger Substanzen erfolgt über die basolaterale Seite, welche in direktem Kontakt zu den Sinusoiden steht. Nach Aufnahme, intrazellulärem Transport und Biotransformation werden gallepflichtige Substanzen an der kanalikulären Membran über verschiedene ATP-abhängige Transportsysteme gegen ein Konzentrationsgefälle in den Gallekanalikus abgegeben.

### 1.4.1 Basolaterale Gallensalzaufnahme

Die in der Leber synthetisierten Gallensalze werden in die Galle abgegeben. Sie unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf, wodurch sie im terminalen Ileum bis zu 95% rückresorbiert werden. Die Aufnahme in die Leberzelle erfolgt durch einen aktiven Aufnahmemechanismus und mittels Natrium-abhängiger (Ntcp) bzw. -unabhängiger Transporter (Oatp-Familie) (Nathanson et al. 1991, Meier 1995).

#### 1.4.1.1 Natrium-abhängige Aufnahme von Gallensalzen

Der basolateral lokalisierte Natrium-abhängige Gallensalztransporter Ntcp (Natrium-Taurocholat-Cotransporting-Polypeptid; Slc10a1) besteht aus 362 Aminosäuren, besitzt 2 NH<sub>2</sub>-terminale Glykosylierungsstellen, 7 Transmembrandomänen und weist ein Molekulargewicht von 51 kDa auf (Ananthanarayanan et al. 1994, Hagenbuch et al. 1991, Stieger et al. 1994). Die Expression des Proteins wird durch ein komplexes Zusammenspiel von sog. nukleären Rezeptoren (z.B. RXR $\alpha$ /RAR $\alpha$ ) und Transkriptionsfaktoren (HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  und HNF3 $\beta$ , sowie SHP-1) geregelt (Meier und Stieger 2002, Trauner und Boyer 2003, Anwer 2004, Wagner und Trauner 2005b, Geier et al. 2006).



Im nativen Zustand ist der Transporter homogen über den Leberlobulus verteilt (Stieger et al. 1994) und dient der unidirektionalen Aufnahme von Gallensalzen. Dabei werden bis zu 80% der konjugierten (z.B. Taurocholat) und 50% der unkonjugierten Gallensalze (Anwer et al. 1978, Hagenbuch und Meier 1996, Kullak-Ublick et al. 2000, Meier und Stieger 2002) transportiert. Weitere physiologische Substrate sind Östrogenkonjugate, Bromosulfophthalein und Schilddrüsenhormone (Meier et al. 1997, Kullak-Ublick et al. 2000, Meier und Stieger 2002). Mit jedem transportierten Substratmolekül werden zwei Natriumionen in die Zelle aufgenommen (Hagenbuch und Meier 1996, Weinmann 1997).

#### **1.4.1.2 Natrium-unabhängige Aufnahme von Gallensalzen**

Während die Natrium-abhängige Aufnahme der Gallensalze in der Rattenleber fast ausschließlich über Ntcp reguliert wird, erfolgt der Natrium-unabhängige Import über eine Vielzahl verschiedener Transportproteine. Die Familie der organischen Anionentransporter ist an der basolateralen Hepatozytenmembran lokalisiert (vgl. Kapitel 1.4.2). Die Oatp-Isoformen bei der Ratte (Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2) verfügen über ein sehr weites Substratspektrum. Dabei werden v.a. amphipathische organische Substanzen gegen anionische Substrate (Gluthation, GSH) ausgetauscht. Der Anteil der transportierten Gallensalze ist dabei geringer als bei Ntcp (Trauner und Boyer 2003).

## 1.4.2 Basolaterale Aufnahme von organischen Anionen

Die Familie der "Organic-Anion-Transporting-Polypeptide" (Oatp) besteht aus multispezifischen Transportersystemen mit einem weiten Substratspektrum. Alle Transporter sind Glykoproteine und besitzen 12 Transmembrandomänen. Transportiert werden sowohl endogene, als auch exogene amphipathische Moleküle wie z.B. konjugierte und unkonjugierte Gallensalze, Bromosulfophthalein, Bilirubin, Herzglykoside, neutrale Steroide, lineare und zyklische Peptide, sowie verschiedene Kationen und Arzneimittel (Petzinger 1994, Kullak-Ublick et al. 2000, Meier et al. 1997, Meier und Stieger 2002). Diese werden gegen intrazelluläre anionische Komponenten (GSH,  $\text{HCO}_3^-$ ) (Kullak-Ublick et al. 2000) ausgetauscht. Im Folgenden werden die in der Rattenleber exprimierten Oatp-Isoformen besprochen.

### 1.4.2.1 "*Organic-Anion-Transporting-Polypeptid*" 1a1

Der Oatp1a1 (Oatp1, Slc21a1) war der erste Transporter der Oatp-Familie, der funktionell charakterisiert wurde (Meier et al. 1997). Das Molekül besteht aus 670 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa (Jacquemin et al. 1994). Der Transporter ist im Leber-Lobulus homogen exprimiert. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Familie transportiert Oatp1a1 v.a. Bilirubin, jedoch keine konjugierten Gallensalze (Trauner und Boyer 2002, Kullak-Ublick et al. 2000). Der Transporter ist nicht nur in der Leber, sondern auch in der Niere und in den Epithelzellen des Plexus choroideus (Angeletti et al. 1997, Bergwerk et al. 1996) exprimiert. Die Aufnahme von Substraten erfolgt im Austausch mit Glutathion (Li et al. 1998).

### 1.4.2.2 "*Organic-Anion-Transporting-Polypeptid*" 1a4

Oatp1a4 (Oatp2, Slc21a5) besteht aus 661 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 92 kDa und besitzt 77% Aminosäureidentität zu Oatp1a1 (Noe et al. 1997, Reichel et al. 1999). Physiologischerweise ist die Expression in der perivenösen Zone stärker als in der periportalen Zone. In Hepatozyten in unmittelbarer Nähe der Zentralvene wird Oatp1a4 jedoch kaum exprimiert

(Kakyo et al. 1999a, Reichel et al. 1999). Die Substratspezifität ist ähnlich der von Oatp1a1. Bilirubin und Schilddrüsenhormone werden jedoch nicht transportiert (Kullak-Ublick 1999, Meier et al. 1997). Dagegen liegt eine hohe Affinität für Digoxin vor (Noe et al. 1997). Außerhalb der Leber wird Oatp1a4 zusätzlich in der Retina und im Gehirn exprimiert (Gao et al. 1999). Im Gegensatz zu den anderen beiden hier beschriebenen Isoformen der Oatp-Familie ist die Expression von Oatp1a4 abhängig von dem nukleären Rezeptor PXR ("pregnane-X-receptor") (Guo et al. 2002, Hagenbuch und Dawson 2004).

#### **1.4.2.3 "Organic-Anion-Transporting-Polypeptid" 1b2**

Oatp1b2 (Oatp4, Slc21a10) wurde zum ersten Mal im Jahr 1999 beschrieben (Kakyo et al. 1999b). Er besteht aus 691 Aminosäuren, besitzt ein molekulares Gewicht von 85 kDa und kommt ausschließlich in der basolateralen Hepatozytenmembran vor (Cattori et al. 2001). Auch dieser Transporter ist heterogen über den Leberazinus verteilt. Eine hohe Expression besteht in der Zone 2 und 3. Neben dem Transport von Bromsulfophthalein und Bilirubin ist Oatp1b2 zusätzlich an der Aufnahme von Cholezystokinin (Stieger und Meier 2002), Leukotrien C<sub>4</sub> (Kullak-Ublick et al. 2000) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (Cattori et al. 2001) beteiligt. Verglichen mit Oatp1a1 liegt für die beiden letztgenannten Substrate nur eine geringe Affinität vor.

### 1.4.3 Kanalikuläre Gallensalzsekretion

Der kanalikuläre Transport von Gallensalzen bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Gallebildung. Das ATP-abhängige Transportsystem befindet sich in der apikalen Hepatozytenmembran und ist Mitglied der "ATP-binding-cassette"(ABC)-Superfamilie. Diese besitzen die Eigenschaft, durch Hydrolyse von ATP gallepflichtige Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten (bis zu einem 1000-fachen der hepatozellulären Konzentration) zu transportieren. Die ABC-Transporter besitzen mindestens 12 Transmembrandomänen, welche die Substratspezifität bestimmen, sowie 2 intrazelluläre Loops, die zur Bindung und Hydrolyse des ATP benötigt werden (Stieger und Meier 2002).

Die kanalikuläre Sekretion monovalenter Gallensalze erfolgt über die "Bile-Salt-Export-Pump" (Bsep, Abcb11). Diese wurde ursprünglich als Spgp ("sister of P-glycoprotein") bezeichnet, besteht aus 1321 Aminosäuren mit 12 Transmembrandomänen, besitzt ein Molekulargewicht von 160 kDa und ist physiologischerweise homogen im Azinus verteilt. Der Transporter befindet sich in den Mikrovilli der kanalikulären Membran (Stieger und Meier 2002), ist aber auch zu einem geringen Anteil subkanalikulär in Vesikeln (Gerloff et al. 1998, Kipp und Arias 2002) lokalisiert. Es werden hauptsächlich konjugierte Gallensalze wie Taurocholat, Glycocholat, Taurochenodeoxycholat und Tauroursodeoxycholat (Kullak-Ublick et al. 2000, Stieger und Meier 2002) transportiert. Aufgrund des ATP-abhängigen Transports ist die Funktion von Bsep der limitierende Faktor bei der Gallesekretion und bestimmt den "gallensalzabhängigen" Gallefluss.

#### **1.4.4 Kanalikuläre Sekretion von organischen Anionen**

Als kanalikuläre Exportpumpe für organische Anionen wurde das Multidrug Resistance Protein 2 (Mrp2, Abcc2) identifiziert. Dieser Transporter ist an der apikalen (kanalikulären) Hepatozytenmembran lokalisiert, vermittelt den ATP-abhängigen Transport organischer Anionen sowie deren Konjugate mit Glucuronsäure, Glutathion oder Sulfat und ist für den gallensalzunabhängigen Gallefluss verantwortlich. Physiologischerweise ist Mrp2 homogen über den Leberlobulus verteilt.

#### **1.4.5 Basolateraler Export von Gallensalzen und organischen Anionen**

Das Multidrug Resistance Protein 3 (Mrp3, Abcc3) befindet sich physiologischerweise in der basolateralen Membran von Cholangiozyten und Glutaminsynthetase-positiver Hepatozyten (Donner und Keppler 2001, Soroka et al. 2001). Es vermittelt den ATP-abhängigen Transport organischer Anionen und Gallensalze aus der Leberzelle in das sinusoidale Blut (Hirohashi et al. 1999).

Das Multidrug Resistance Protein 4 (Mrp4, Abcc4) ist hauptsächlich in den apikalen Membranen der proximalen Nierentubuli lokalisiert. Daneben wird das ATP-abhängige Transportsystem auch zu einem geringen Anteil in anderen Organen (Lunge, Gehirn, Darm und Leber) exprimiert (Chen und Klaassen 2004). In der Leber befindet sich Mrp4 in Hepatozyten und Cholangiozyten. Das Protein besitzt ein breites Substratspektrum für organische Anionen und transportiert v.a. zyklische Nukleotide und Sulfatkonjugate der Gallensalze (Trauner und Boyer 2003).

Das im aktivierten Zustand als Heterodimer vorliegende Transportsystem "Organic solute transporter" Ost  $\alpha/\beta$  ist in den basolateralen Membranen der Enterozyten des Ileums lokalisiert. Des Weiteren wird es zu einem geringen Anteil in der Niere und in der Leber exprimiert (Dawson et al. 2005). Das Protein transportiert neben Gallensalzen auch Digoxin und Prostaglandin E2.

### 1.4.6 Regulation von hepatobiliären Transportern bei Cholestase

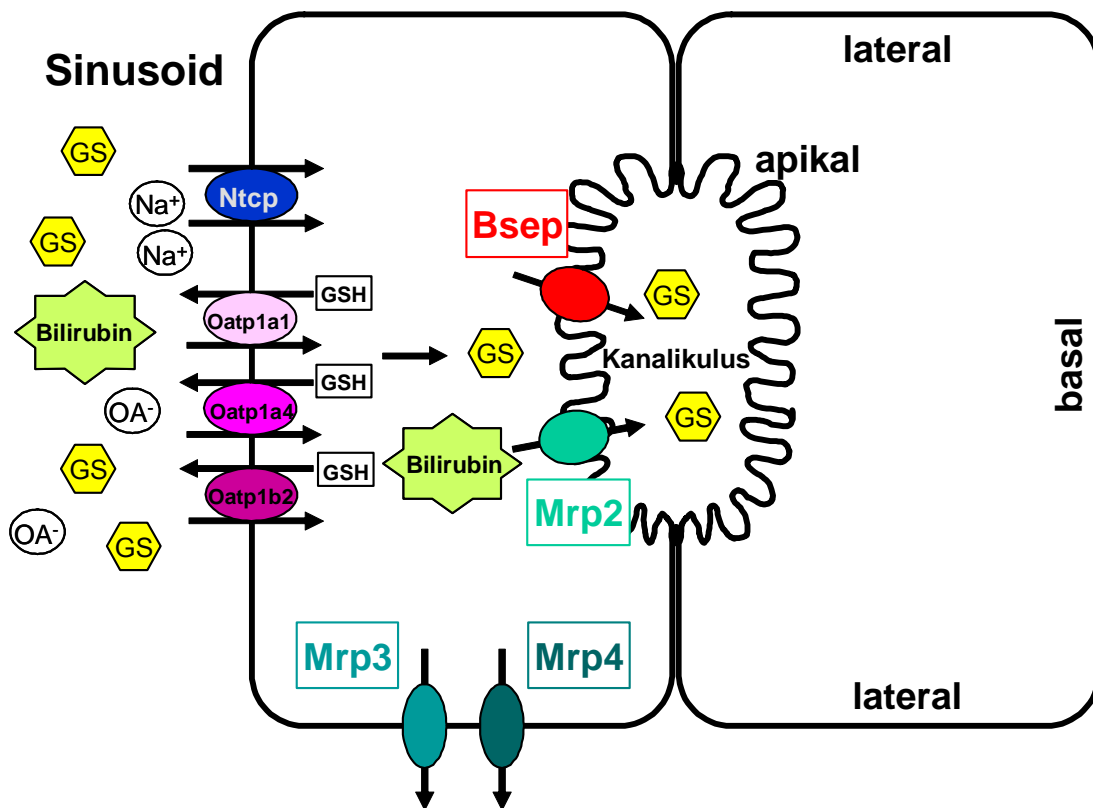
Ursache für die Entstehung einer Cholestase kann z.B. eine Obstruktion der ableitenden Gallewege, Arzneimittel oder eine systemische Entzündung sein. In Folge dessen kommt es zu einer Regulation von hepatobiliären Transporterproteinen.

Unter cholestatischen Bedingungen, z.B. Lipopolysaccharid-Behandlung (Trauner et al. 1997, Vos et al. 1998, Kubitz et al. 1999, Dombrowski et al. 2000), Gallengangsligatur (Trauner et al. 1997, Paulusma et al. 2000), durch Auslösen von oxidativem Stress (Schmitt et al. 2000) und bei hyperosmotischer Zellschrumpfung (Kubitz et al. 1997, Dombrowski et al. 2000) wurde sowohl eine transkriptionelle Herabregulation, als auch eine Endozytose von Mrp2 aus der kanalikulären Membran beschrieben. Die Herabregulation bei obstruktiver Cholestase findet v.a. in periportalen Hepatozyten statt, es kommt zu einer Verminderung der hepatobiliären Sekretion.

Sowohl drei Tage nach Gallengangsligatur (Trauner et al. 1999, Soroka et al. 2001, Donner und Keppler 2001), als auch 12 Stunden nach Gabe von Lipopolysaccharid (Donner et al. 2004) kommt es zu einer signifikanten Induktion des Mrp3, die perizentral beginnt und sich nach periportal ausdehnt. Die Regulation von Mrp3 bei verschiedenen Cholestaseformen verläuft somit invers zur Regulation von Mrp2. Diese Regulation von Mrp2 und Mrp3 soll die Leberzelle bei Cholestase vor einer Akkumulation von Gallensalzen und toxischen Substanzen im Zytoplasma reduzieren und somit eine Schädigung der Hepatozyten minimieren.

Unter cholestatischen Bedingungen kommt es an der basolateralen Membran der Hepatozyten zu einem signifikanten Anstieg der Proteinexpression von Mrp4 sowie zu einer starken Herabregulation des Transportproteins in der Niere (Denk et al. 2004). Die Expression von Ost  $\alpha/\beta$  verändert sich insofern, dass es unter cholestatischen Bedingungen es zu einer FXR-abhängigen Steigerung der Proteinexpression in den basolateralen Membranen des Hepatozyten kommt. Diese Regulation stellt einen weiteren alternativen Exportmechanismus

von akkumulierenden hepatozellulären Gallensalzen in die Blutzirkulation dar und kann so bei Cholestase zur alternativen Ausscheidung cholephiler Substanzen beitragen (Boyer et al. 2006).



**Abb. 5 Schematische Darstellung der Expression von hepatobiliären Transportern in der Rattenleber.** An der basolateralen Membran erfolgt die Aufnahme der Gallensalze und anderer gallepflichtiger Substanzen aus dem sinusoidalen Blut Natrium-abhängig oder -unabhängig über den Ntcp bzw. die Isoformen der Oatp-Familie (Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2). Nach Biotransformation und transzellulärem Transport erfolgt der Export der Gallensalze und organischen Anionen über die ATP-abhängigen Exportpumpen Bsep und Mrp2 (GS, Gallensalze; Na<sup>+</sup>, Natrium-Ion; OA<sup>-</sup>, organisches Anion, GSH, Glutathion) nach Trauner et al. 1998.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Unter physiologischen Bedingungen wird eine gleichmäßige lobuläre Verteilung für Ntcp, Oatp1a1 und Mrp2 beschrieben. Dagegen werden Oatp1a4 und Oatp1b2, sowie Mrp3 v.a. perivenös exprimiert.

Bei verschiedenen Cholestaseformen kommt es zu Veränderungen der Expression hepatobiliärer Transporter. Das Ziel ist die Minimierung der kanalikulären Sekretion und Förderung alternativer basolateraler Exportmechanismen für toxische Gallensalze, so dass eine Schädigung von Hepatozyten und Cholangiozyten verhindert wird. Bei obstruktiver Cholestase kommt es insbesondere periportal zu einer Herabregulation von Mrp2 (Paulusma et al. 2000). Gleichzeitig dehnt sich die Expression von Mrp3 von perivenös nach periportal aus (Donner und Keppler 2001). Diese inverse Regulation ist ein Paradigma für die differentielle lobuläre Expression einzelner Transporter.

Es liegen keine weiteren Erkenntnisse über die zonale Regulation anderer hepatobiliärer Transporter vor. Vor dem Hintergrund der Regulation von Mrp2 und 3 ist auch für die Transportsysteme Ntcp und die Mitglieder der Oatp-Familie eine zonierte Regulation bei Cholestase zu erwarten.

Es sollen daher in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Unterliegen die Transporter Ntcp, Oatp 1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 und Bsep bei verschiedenen Cholestasemodellen ebenfalls einer zonierten Regulation?
2. Wie ist die zonale Verteilung von Granulozyten, Makrophagen und proinflammatorischen Zytokinen bei verschiedenen Cholestaseformen?
3. Unterliegt die zonierte Regulation hepatobiliärer Transporter einem zytokinabhängigem Mechanismus?



## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Chemikalien (in Reinstform)	Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen)
Acrylamid	AppliChem (Darmstadt)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
Lipopolysaccharid	Sigma (Deisenhofen)
Anakinra (AMG 719)	Amgen (Thousand Oaks, CA, USA)
Etanercept	Wyeth (Münster)

### 2.2 Puffer

PBS	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	Na/K-Phosphat pH 7,5	10 mM
TBST	Tris	19,8 mM
	NaCl	67,6 mM
	Tween	0,2%
Krebs-Henseleit Puffer	NaCl	115 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
	KCl	5,9 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,18 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,23 mM
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,25 mM

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primärantikörper

Antikörper		Referenz	Verdünnung (Immunoblot/ Immunfluoreszenz)	
K44	Polyklonaler AK gegen Bsep (Kaninchen)	Prof. Dr. B. Stieger (Zürich, Schweiz)	1:5000	1:200
K4	Polyklonaler AK gegen Ntcp (Kaninchen)	Prof. Dr. B. Stieger (Zürich, Schweiz)	1:2000	1:200
K10	Polyklonaler AK gegen Oatp1a1 (Kaninchen)	Prof. Dr. B. Stieger (Zürich, Schweiz)	1:1000	1:200
K15	Polyklonaler AK gegen Oatp1b2 (Kaninchen)	Prof. Dr. B. Stieger (Zürich, Schweiz)	1:1000	1:200
K22	Polyklonaler AK gegen Oatp1a4 (Kaninchen)	Prof. Dr. B. Stieger (Zürich, Schweiz)	1:1000	1:200
MPO	Polyklonaler AK gegen Myeloperoxidase (Kaninchen)	DAKO Chemicals (Hamburg)		1:200
ED2	Polyklonaler AK (CD163) gegen Kupffer'sche Sternzellen (Maus)	Serotec (Oxford, UK)		1:25
IL-1 $\beta$	Polyklonaler AK gegen Interleukin 1 $\beta$ (Ratte)	Biosource (Camarillo, CA, USA)		1:50
$\alpha$ -GS	Monoklonaler AK gegen Glutaminsynthetase (Maus)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)		1:200

### 2.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper		Referenz	Verdünnung (Immunoblot/ Immunfluoreszenz)	
goat-Cy3- $\alpha$ - rabbit	Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen AK	Dianova (Hamburg)		1:500
goat-Cy3- $\alpha$ - mouse	Cy3-gekoppelter anti-Maus AK	Dianova (Hamburg)		1:500
goat-FITC- $\alpha$ -rabbit	FITC-gekoppelter anti-Kaninchen AK	Dianova (Hamburg)		1:100
goat-FITC- $\alpha$ -mouse	FITC-gekoppelter anti-Maus AK	Dianova (Hamburg)		1:100
Horseradish- peroxidase- conjugated- donkey- $\alpha$ - rabbit	Meerrettich- Peroxidase gekoppeltes anti- Kaninchen IgG	Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK)	1:7500	
Horseradish- peroxidase- conjugated- sheep- $\alpha$ - mouse	Meerrettich- Peroxidase gekoppeltes anti- Maus IgG	Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK)	1:7500	

## 2.4 Größen- und Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde der "Full Range Rainbow Marker RPN 800" der Firma Amersham eingesetzt. Er enthält Proteine der folgenden Molekulargewichte:

10 kDa, 15 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 105 kDa, 160 kDa und 250 kDa.

## 2.5 Homogenisierungspuffer

HN-Puffer (pH 7.6)	Tris HCl	10 mM
	Sucrose	250 mM

## 2.6 Lösungen zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten

RL-Puffer (2M, pH 7.4)	NaCl	28 mM
	NaF	10 mM
	Na-Pyrophosphat	10 mM
	Triton-X-100	1%
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Na-Vanadat	1 mM
	$\beta$ -Glycerophosphat	20 mM

## 2.7 Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und den Western Blot

Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer	SDS	17,3 mM
	Tris	123 mM
	Glycin	1241,7 mM

Blottingpuffer	SDS	2,1 mM
	Glycin	766,2 mM
	Tris	95,8 mM

TBST	H <sub>2</sub> O	900 ml
	Tris	100 ml
	Tween 20	1 ml

## 2.8 Primer für die Real Time-PCR

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt und geliefert.

Ntcp	5'-GTCCAACCTCTTCACCCTGG-3' 5'-ACGATGCTGAGGTTTCATGTCC-3'
Bsep	5'-GCCGACCAGTTGGCTCAT-3' 5'-CCCACACATAGCCGTCTAC-3'
Oatp1a1	5'-GGAGAGAAGGAAAGCGAGCA-3' 5'-CTCGACCTGAGGACTTCCATG-3'
Oatp1a4	5'-TTCCAGTGGCAGGCTTAACAA-3' 5'-ATAGTTGGTGCTGAACCCCTTC-3'
Oatp1b2	5'-TTCACCTTGCTGGCAGGATG-3' 5'-TTCGGCTTCTTATCACCACGA-3'
Hprt	5'-TTGAATCATGTTTGTGTCATCAGC-3' 5'-GGCTTTGTACTTGGCTTTTCCAC-3'

## 2.9 Fotoarbeiten und Bildverarbeitung

Röntgenentwickler:	AGFA Curix 60, Köln
Röntgenfilm:	Hyperfilm, Amersham
Konfokales Mikroskop:	Zeiss Axiovet 100M Carl Zeiss, Laser Scanning Microscope LSM 510, Version 3.2 SP 2
Computersystem:	Windows NT, Microsoft Corporation, Mountain View, CA, USA
Bildverarbeitung:	Picture Publisher, Micrografx, Richardson, USA

## 2.10 Sonstige Materialien

Objektträger:	Microscope Slides, Engelbrecht, Edermünde
PCR 96 Well Platte:	Micro Amp Optical 96- Well Reaction Plate, Applied Biosystems
Abdeckungsfolie 96 Well:	Optical Adhesive Cavers, Applied Biosystems

## 2.11 Geräte

Kryotom:	Leica CM 3050 S
Ultrazentrifuge:	Beckman Coulter tl-100 Ultrazentrifuge
Zentrifuge:	Centrifuge 5415 R, Eppendorf
Blotting-Kammer:	Multiphor II, Pharmacia
RT-PCR:	7500 Real Time PCR Systems, Applied Biosystems

## 3 Methoden

### 3.1 RNA-Präparation und Real Time-PCR

Zur Durchführung einer RT-PCR wurde zunächst RNA isoliert. Die RNA wurde anschließend in DNA umgeschrieben, da die Ausgangs-RNA nicht sofort als Matrize von der *Taq*-Polymerase genutzt werden kann. Dies geschieht in der sog. reversen Transkription, bei der RNA-abhängige DNA-Polymerasen genutzt werden, um zunächst eine komplementäre DNA, die cDNA herzustellen.

#### 3.1.1 Aufbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Leberproben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff grob zermörsert. Im Anschluss daran wurde für die Aufbereitung der Proben RLT-Puffer (ein handelsüblicher Puffer der Fa. QIAGEN, Hilden, der u.a. Guanidinisothiocyanat enthält) verwendet, dem zuvor  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 1% zugesetzt wurde (Lysis-Puffer). Das Zermörsern und die Zugabe des Puffers bewirken einen Aufschluss der Zelle, wobei das zusätzlich hinzugefügte  $\beta$ -Mercaptoethanol zu einer Lösung der Disulfidbrücken der Proteine und somit zu einer Aufspaltung der Quartärstruktur in eine Tertiär- bzw. Sekundärstruktur führt.

#### 3.1.2 RNA-Isolierung

Die Präparation der RNA erfolgte mit Hilfe eines "RNeasy Mini Kit 250" (Qiagen, Hilden), welcher zusätzlich einen Qia Shredder enthält. Bei dieser Methode wird zunächst ein Volumen von 0,15 - 1 g der aufbereiteten Leberproben einem Puffer mit Guanidinisothiocyanat zugegeben und homogenisiert. Diesem Lysat wird Ethanol hinzugefügt, wodurch die selektive Bindung der RNA an die spezielle "RNeasy Membran" mit Silikatgel gefördert wird. Anschließend

erfolgen eine Elution von Zelldritus und das Verbringen der aufgereinigten RNA in RNA-freies Wasser.

### 3.1.3 Konzentrationsmessung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration der zu untersuchenden Proben wurde mit Hilfe des "Pharmacia Biotech Gene Quant II RNA/DNA Calculator" durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden die Proben in eine Glas-Kapillare aufgezogen, anschließend in eine Küvette gestellt und zur Messung in das Gerät verbracht. Dabei ist zu beachten, dass Nukleinsäuren in Lösung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen. Proteine, die als Verunreinigung auftreten, besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$  ermöglicht den Reinheitsgehalt einer nukleinsäurehaltigen Lösung einzuschätzen und dient somit als Qualitätskontrolle. Für eine Küvette mit 1 cm Schichtdicke gilt für einzelsträngige RNA, dass eine Einheit  $E_{260\text{nm}}$  40 µg/ml H<sub>2</sub>O entsprechen. Der Wert des Quotienten sollte größer oder gleich zwei sein.

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100%igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Sie kann daher mathematisch wie folgt beschrieben werden:

$$Y = X (1+EF)^n$$

Dabei ist **Y** die Menge an hergestelltem Amplifikat, **X** die Startkopienzahl zu Beginn der PCR, **EF** die Effizienz der Reaktion und **n** die Anzahl der PCR-Zyklen.

Zur Erstellung einer Standardkurve wird diese Gleichung dann in ihre logarithmierte Form umgeschrieben:

$$\log Y = \log X + n \log (1+EF)$$



### 3.1.4 Reverse Transkription

Die Herstellung der cDNA erfolgte durch Anwendung des "1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)" der Firma Roche. Bei dieser Methode wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase Einzelstrang cDNA synthetisiert, die anschließend als Template in der PCR eingesetzt wird.

Zunächst werden folgende Reagenzien zusammengefügt:

Reagenz	Volumen
10x "Reaction Buffer" (100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3)	2,0 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4,0 µl
Deoxynucleotide Mix	2,0 µl
Oligo-p(dT) <sub>15</sub> Primer	2,0 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl
steriles Wasser	3,2 µl
RNA Probe	5,0 µl

Im Anschluss daran erfolgt eine Inkubation für 10 min bei 25°C, wobei es zur Anlagerung des Primers an die RNA kommt. Im zweiten Inkubationsschritt bei 42°C über 60 min wird die RNA revers transkribiert und die cDNA synthetisiert. Anschließend wird die Reverse Transkriptase durch eine 5-minütige Inkubation bei 99°C inaktiviert.

### 3.1.5 Real Time-PCR

Die Real Time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für DNA, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet.

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Abfolge aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Es werden dabei die Eigenschaften von DNA-Polymerasen zur Hilfe genommen, die, ausgehend von einem DNA-Einzelstrang als Matrize (Template), einen neuen komplementären Strang synthetisieren können.

Das eingesetzte Probenvolumen umfasst 25 µl. In einem ersten Schritt wird die cDNA bei 94°C vollständig denaturiert, d.h. in Einzelstränge aufgetrennt. In einem zweiten Schritt erfolgt nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf eine geeignete und primerspezifische Temperatur die Anlagerung der Oligonukleotide an den jeweiligen Einzelstrang (Annealing). Die Oligonukleotide werden dabei so gewählt, dass sie jeweils Start- und Endpunkt der zu amplifizierenden Sequenz definieren. Die angelagerten Oligonukleotide bilden einen kurzen doppelsträngigen DNA-Bereich mit einem freien 3'-Hydroxyende, den die Polymerasen für ihre Verlängerungsreaktion benötigt. In Anwesenheit von Desoxynukleotiden (dNTP) werden nun in einem dritten Schritt die mit Primern verbundenen Matrizen zu einem Doppelstrang aufgefüllt (Extension bei 72°C). Die neusynthetisierten DNA-Stränge sind zunächst von unbestimmter Länge, besitzen jedoch durch die Primer definierte Ausgangspunkte, die so den zu amplifizierenden Sequenzbereich genau festlegen. Diese neu synthetisierten DNA-Doppelstränge werden in einem zweiten Reaktionszyklus nach erneuter Denaturierung ebenfalls zu Matrizen und können mit den entsprechenden Oligonukleotiden hybridisieren. In einem sich nun anschließendem dritten Reaktionszyklus entstehen daher nur noch doppelsträngige DNA-Moleküle, die von den Primern flankiert sind. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Auffüllreaktion wird die Zielsequenz exponentiell amplifiziert.

Die *Taq*-Polymerase, welche für die PCR verwendet wurde, stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Da es sich hierbei um ein thermophiles Bakterium handelt, hat dessen DNA-Polymerase ein Temperaturoptimum von 72°C und ist darüber hinaus für kurze Zeit bei Temperaturen bis zu 95°C stabil. Dies ist Voraussetzung dafür, dass alle notwendigen Reaktionsschritte ohne Zerstörung des Enzyms im gleichen Reaktionsansatz automatisiert durchgeführt werden können.

Während der Zyklen erfolgt die quantitative Messung, die der Methode RT ("Real Time")-PCR ihren Namen verleiht, mit Hilfe einer Fluoreszenz-Detektion. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, so dass eine Quantifizierung in Relation eines bekannten Gens möglich wird. Eine zusätzliche gelelektrophoretische Auftrennung ist nicht mehr nötig. Die Quantifizierung der PCR-Produkte ist möglich durch Anwendung eines DNA-Farbstoffes (SYBR-Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Der Fluoreszenz-Farbstoff lagert sich an die doppelsträngige DNA an. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der Ct-Wert (Threshold Cycle, "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die des Hintergrundsignals ansteigt.

Nach Abschluss der PCR wird eine Schmelzkurve erstellt, an Hand derer die Spezifität und Qualität der amplifizierten DNA bestimmt werden kann. Bei dieser Schmelzkurven-Analyse wird die DNA denaturiert. Im Folgenden wird die Temperatur langsam erniedrigt, so dass der eingelagerte Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt wird.

## **3.2 Proteinbiochemische Verfahren**

### **3.2.1 Isolierung von Gesamt-Membranfraktionen aus Lebergewebe**

Zur Isolierung der Gesamtmembranfraktion aus Lebergewebe wurde dieses zunächst im Homogenisierungspuffer mit Zusatz von Proteaseinhibitoren zerkleinert und mit einem Teflon-Homogenisator bei 500 rpm homogenisiert. Die Isolierung der Gesamtmembranfraktion erfolgte durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4°C für 60 min. Der Überstand wurde verworfen und die entstandenen Pellets anschließend in RL-Puffer resuspendiert. Die Pellets wurde aliquotiert und sofort weiter verwendet oder bei -80°C gelagert.

### **3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte mit Hilfe des BioRad-Protein-Assay nach Bradford (1976). Für die Messung wurden 2 µl der Probe, 798 µl destilliertes Wasser und 200 µl Bradfordreagenz in einer Einwegküvette gemischt und anschließend die Extinktion  $\Delta E_{595}$  photometrisch in einem LKB Biochrom Ultrospec Plus Photometer gemessen. Die Proteinmenge wurde durch Multiplikation der gemessenen Extinktion mit einem gerätespezifischen Eichfaktor von 3,8 in µg/µl berechnet.

### 3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Größe auf einem SDS-Gel (Laemmli 1970).

Die Gelmatrix entsteht durch eine Polymerisation von Acrylamid (PAA). Mit Hilfe von Ammoniumpersulfat (APS) wird die Polymerisationsreaktion gestartet und durch Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Dabei sind die Porengröße und somit auch die Auftrennungseigenschaften des Gels von der Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid abhängig.

Es wurde 50–100 µg Protein aufgetragen. Um eine möglichst hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei übereinander liegenden Gelsystemen (Sammelgel, Trenngel) mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichem pH-Wert besteht. Zur Auftrennung der Proteine wurden 8%-ige und 15%-ige Polyacrylamid-Trenngele verwendet. Um das relative Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurden Markerproteine bekannter Molekulargewichte parallel zu den zu untersuchenden Proteinen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Voltzahl von 260 V.

Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE:

Gelkomponente	Trenngel		Sammelgel
	8 %	15 %	5 %
1,5 M Tris pH 6,8	/	/	1,25 ml
1 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	/
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	10 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100µl
30 % PAA	2,61 ml	5 ml	1,7 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	4,72 ml	2,3 ml	6,8 ml

### 3.2.4 Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Beim Western Blot werden Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Dabei bleiben sowohl die Immunreaktivität, als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper können anschließend die Proteine antigenetisch identifiziert werden.

#### 3.2.4.1 Proteintransfer

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman, Schleicher und Schuell) erfolgte nach einer Methode von Towbin et al. (1979) mit Hilfe einer "Multiphor II"-Kammer (Pharmacia). Es wurde eine Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> angelegt. Der Proteintransfer wurde nach einer Transferzeit von 1 - 2 Stunden beendet. Der erfolgreiche Transfer und die Proteinauftragsmenge wurden durch Anfärbung der Proteinbanden mit Hilfe einer Ponceau S-Färbung (SERVA, Heidelberg) qualitativ überprüft. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für 30 Minuten in 1% BSA inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C. Vor Detektion des Primärantikörpers mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden drei Waschschrte mit TBST von je 10 Minuten durchgeführt, um nicht gebundenen Primär-Antikörper von der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten wiederum drei Waschschrte für je 10 min in TBST, bevor der Antikörpernachweis durch eine Peroxidase-katalysierte chemische Reaktion erfolgen konnte.

#### **3.2.4.2 Detektion durch Chemolumineszenz**

Die Methode der Chemolumineszenz ist eine sensitive, nichtradioaktive Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen. Die Detektion der Proteine erfolgt durch eine enzymatische Lichtreaktion. Durch den Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper kommt es zu einer Lichtemission (428 nm), wenn  $H_2O_2$  reduziert und Luminol oxidiert wird. Zur Detektion wurde das Enhanced Chemiluminescence Detection System (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat, Pierce, Rockford, USA) verwendet. Die Membran wurde für eine Minute mit den Lösungen dieses Detektionssystems inkubiert und die Lichtemission durch Belichtung eines Films detektiert. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert.

#### **3.2.4.3 Densitometrische Auswertung**

Die Quantifizierung der Signalstärke der spezifischen Banden erfolgte mit Hilfe des Anwendungs-Programm "TotalLab TL 100" (Version 2006, Newcastle upon Tyne, UK). Ausgewertet wurden jeweils 3 - 4 Tiere pro Kontroll- bzw. Tiermodellgruppe. Die mittlere Signalstärke der Banden des Kontrollkollektives diente als Referenz. Alle weiteren Berechnungen wurden auf diesen Wert bezogen. Die statistische Signifikanz wurde durch Anwendung des *Student'schen t-Test* geprüft. Bei  $p < 0.05$  lag ein signifikanter Unterschied vor.

## 3.3 Histologische Methoden

### 3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

#### 3.3.1.1 *Herstellung von Gefrierschnitten*

Mit Hilfe des Kryotoms wurden von den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Rattenlebern  $7\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger verbracht und anschließend für 60 min bei RT getrocknet.

Die Temperatur der Kammer als auch des Objektträgertisches lag bei  $-15^{\circ}\text{C}$ . Nach der Lufttrocknung wurden die Schnitte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.3.1.2 *Fixierung*

Zur Fixierung der Schnitte wurden die Objektträger für 5 Minuten in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Methanol gelagert.

#### 3.3.1.3 *Indirekte Immunfluoreszenz*

Die Schnitte wurden zunächst  $1 \times 20\ \text{sec}$  und danach  $2 \times 10\ \text{min}$  in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 30 min mit 5% FCS in  $1 \times \text{PBS}$  blockiert. Die Inkubation des Erstantikörpers (verdünnt mit 5% FCS in  $1 \times \text{PBS}$ ) erfolgte über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Dabei wurden die Schnitte in eine feuchter Kammer (Petrischale, ausgelegt mit Whatman-Papier "GB002, Whatman, Schleicher und Schuell", getränkt in PBS und mit Parafilm beschichtet) gelagert. Am nächsten Tag wurde das Antiserum durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Proben mit dem Sekundär-Antikörper (verdünnt mit 5% FCS in  $1 \times \text{PBS}$ ) für 60 min bei RT in einer abgedunkelten Feuchtkammer. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit PBS für je 10 min. Nach einem anschließenden Waschen für 5 min in Aqua dest. wurden die Schnitte mit "Mounting Medium" und Deckgläschen versehen und für 24h bei  $4^{\circ}\text{C}$  in horizontaler Lage getrocknet. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgte lichtgeschützt und bei  $4^{\circ}\text{C}$ .



#### **3.3.1.4 Konfokale Laserscanningmikroskopie**

Die Leberschnitte wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops, ausgestattet mit einem Argon-Krypton und einem Helium-Neon Laser analysiert. Die Bilder wurden durch Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen (488 nm und 568 nm) generiert. Die Emission wurde bei  $530 \pm 10$  nm (grün) und  $>590$  nm (rot) gemessen. Kolokalisation von grüner (FITC) und roter (Cy3) Fluoreszenz resultierte in einem gelben Signal. Es wurden nur Proben miteinander verglichen, die in allen Aufarbeitungsschritten parallel verarbeitet und unter identischen Aufnahmebedingungen (Objektiv, Linsen, Pinhole, Formatgröße und Zoom, Filtereinstellungen, Scan-Modus) erstellt wurden.

#### **3.3.1.5 Densitometrische Analyse**

Zur densitometrischen Auswertung wurde von jeweils vier Kontrolltieren und vier behandelten Tieren je eine Übersichtsaufnahme mit periportal und perizentraler Zone eines Lobulus untersucht. Die maximale Intensität der Cy3-Fluoreszenz wurde durch einen  $12 \mu\text{m}$  langen Cursor, der im rechten Winkel über das Membransignal platziert wurde, gemessen. Diese Berechnung wurde an jeweils 10 verschiedenen Membranen in einem Radius von  $40 \mu\text{m}$  von der Zentralvene bzw. von einem Periportalfeld durchgeführt. Anschließend wurde das zytoplasmatische Hintergrundsignal von dem Maximalwert subtrahiert. Die Daten wurden in eine MS-Excel Tabelle überführt. Danach wurde aus den 10 Werten pro Feld ein Durchschnittswert pro Zone und Tier errechnet. Anschließend wurde aus diesen Werten ein Durchschnittswert für beide Zonen je Tiergruppe errechnet. Die mittlere densitometrische Signalstärke der periportal Zone des Kontrollkollektives diente als Referenz. Die periportal densitometrischen Messwerte der Kontrollen sowie die densitometrischen Messungen der behandelten Tiere wurden auf diesen Wert bezogen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student'schen t-Tests* errechnet und  $p < 0.05$  als statistisch signifikant betrachtet.

## **3.4 Tierversuche**

### **3.4.1 Versuchstiere und Haltung**

Für die Tierversuche wurden männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 200 - 250 gr eingesetzt. Die Tiere wurden in einem temperaturkontrolliertem Raum (21 - 23°C) mit gleich bleibendem Tag-Nacht-Rhythmus (Licht von 6:00 bis 18:00 Uhr) und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Die Behandlung erfolgte entsprechend der Kriterien der Leitlinie "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication, 86-23, 1985). Das Versuchsprotokoll wurde von dem Tierschutzbeauftragten des Regierungspräsidiums Düsseldorf genehmigt.

#### **3.4.1.1 Gallengangsligatur**

Die Tierversuche für das Modell der obstruktiven Cholestase wurden von Dr. Markus G. Donner durchgeführt.

##### **3.4.1.1.1 Operation**

Die Tiere wurden mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) anästhesiert. Die Bauchhöhle wurde an der Linea alba eröffnet und der Ductus choledochus dargestellt. In unmittelbarer Nähe des Leberhilus wurde eine Doppelligatur angelegt und der Gallengang anschließend zwischen diesen beiden Ligaturen durchtrennt. Bei den Kontrolltieren wurde ebenfalls die Bauchhöhle eröffnet, der Ductus choledochus aufgesucht und dargestellt, allerdings nicht ligiert. Im Anschluss daran erfolgte eine zweischichtige Naht zum Verschluss der Bauchhöhle.

#### **3.4.1.1.2 Zytokininhibition**

Für die Inhibition von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde den Versuchstieren zum Zeitpunkt der Laparotomie und Gallengangsligatur entweder Etanercept in einer Dosierung von 8 mg/kg/KGW oder Anakinra in einer Dosierung von 100 mg/kg/KGW i.p. injiziert. Im Anschluss daran erfolgte alle 48h eine erneute Injektion von Etanercept, während Anakinra alle 24h i.p. appliziert wurde. Die Organpräparation erfolgte nach 3d und 7d post operationem.

#### **3.4.1.1.3 Organentnahme**

Nach einem Zeitraum von 1d, 3d und 7d post operationem wurden die Tiere erneut anästhesiert (Arzneimittel und Dosierung vgl. 3.4.1.1.1). Es erfolgte eine Blut- und Urinentnahme zur Kontrolle des Erfolgs der Gallengangsligatur. Die Leber wurde zur Entfernung der korpuskulären Blutbestandteile in situ für 2 min mit 37°C warmen Krebs-Henseleit-Puffer (305 mOsm/L, 0,3 mmol/l Pyruvat und 2,1 mmol/l Acetat für 5 Min äquilibriert mit 5%/95% vol/vol CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>) perfundiert. Anschließend wurde das Organ entnommen, aliquotiert und unverzüglich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **3.4.1.2 Lipopolysaccharid-Gabe**

Die Lebern der mit Lipopolysaccharid behandelten Tiere wurden freundlicherweise von Dr. Boris Görg zur Verfügung gestellt.

#### **3.4.1.2.1 Dosierung und Injektion**

Es wurde einmalig LPS in einer Dosis von 4 mg/kg/KGW intraperitoneal injiziert. Den Kontrolltieren für diese Versuchsreihe wurde 0,9% NaCl appliziert.

#### **3.4.1.2.2 Organentnahme**

Nach einer Zeitspanne von 6h, 12h und 24h wurde die Narkose eingeleitet. Das weitere Vorgehen entsprach dem der gallengangsligierten Tiere (vgl. 3.4.1.1.3).

## 4 Ergebnisse

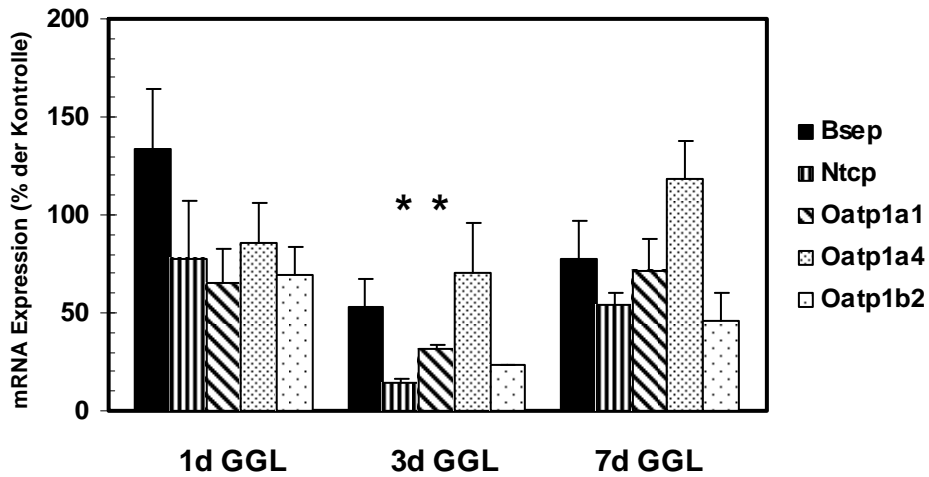
### 4.1 Real Time-PCR

Die gesamte RNA-Fraktion der aufbereiteten Leberhomogenate wurde isoliert und revers transkribiert. Die Genexpression wurde mit Hilfe der Real Time PCR gemessen. Hprt (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) wurde nach dem Prinzip der relativen Quantifizierung als interner Standard verwendet. Die errechneten Daten drücken das Verhältnis von mRNA Kopien der untersuchten Proben zu Hprt mRNA Kopien aus, bezogen auf die Werte der Kontrolltiere.

#### 4.1.1 mRNA-Expression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase

Die Expression von *Bsep* mRNA war am Tag 1 ( $134 \pm 30\%$ ), Tag 3 ( $53 \pm 14\%$ ) und Tag 7 ( $78 \pm 19\%$ ) nach Gallengangsligatur nicht signifikant verändert. Einen Tag nach Gallengangsligatur war die mRNA-Expression von *Ntcp* zunächst nicht signifikant verändert ( $77 \pm 30\%$ ). Nach drei Tagen obstruktiver Cholestase fand sich eine signifikante Herabregulation auf  $15 \pm 2\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle). Am 7. Tag post operationem war die *Ntcp*-RNA reduziert ( $54 \pm 6\%$ ), die Expression war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrolltieren. Die mRNA-Expression der *Oatp*-Isoformen unterlag einer vergleichbaren Regulation. Am 1. Tag nach GGL kam es zu einer nicht-signifikanten Abnahme der Expression (*Oatp1a1*  $65 \pm 18\%$ , *Oatp1a4*  $86 \pm 20\%$  und *Oatp1b2*  $70 \pm 14\%$ ). *Oatp1a4* war am Tag 3 nach Gallengangsligatur signifikant herabreguliert ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle).

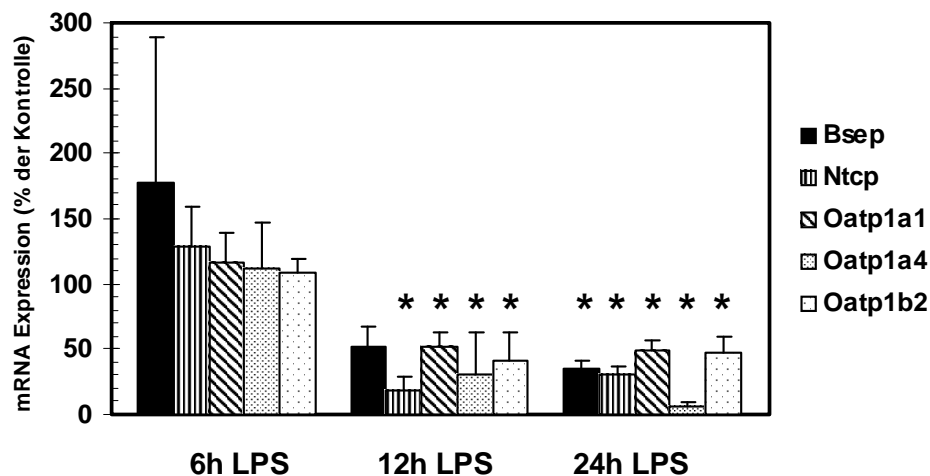
Zum Zeitpunkt 7 Tage nach Gallengangligatur war die Expression aller drei *Oatp*-Isoformen nicht signifikant verändert (*Oatp1a1*  $72 \pm 16\%$ , *Oatp1b2*  $46 \pm 15\%$  und *Oatp1a4*  $119 \pm 19\%$ ).



**Abb. 6 Real Time-PCR-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach obstruktiver Cholestase.** Die RNA von 3-4 Leberhomogenaten wurde isoliert und revers transkribiert. Die Genexpression von Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 wurde mittels RT-PCR bestimmt. Als interner Standard diente Hprt (\* $p < 0.05$  im Vergleich zu den Kontrolltieren).

#### 4.1.2 mRNA-Expression von hepatobiliären Transportern nach Lipopolysaccharid-Gabe

Bei allen untersuchten Transportsystemen war die mRNA-Expression 6h nach LPS-Gabe nicht signifikant verändert. Nach 12h erfolgte ein signifikanter Abfall der mRNA-Expression ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) von *Ntcp* auf  $18 \pm 11\%$ , *Oatp1a1* auf  $52 \pm 11\%$ , *Oatp1a4* auf  $30 \pm 33\%$  und *Oatp1b2* auf  $42 \pm 21\%$ . Zum Zeitpunkt 24h nach Applikation von Lipopolysaccharid war die mRNA aller bestimmten Transporterproteine signifikant verringert ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle): *Bsep*  $36 \pm 5\%$ , *Ntcp*  $30 \pm 7\%$ , *Oatp1a1*  $49 \pm 8\%$ , *Oatp1a4*  $6 \pm 3\%$  und *Oatp1b2*  $47 \pm 13\%$  (Abb. 7).



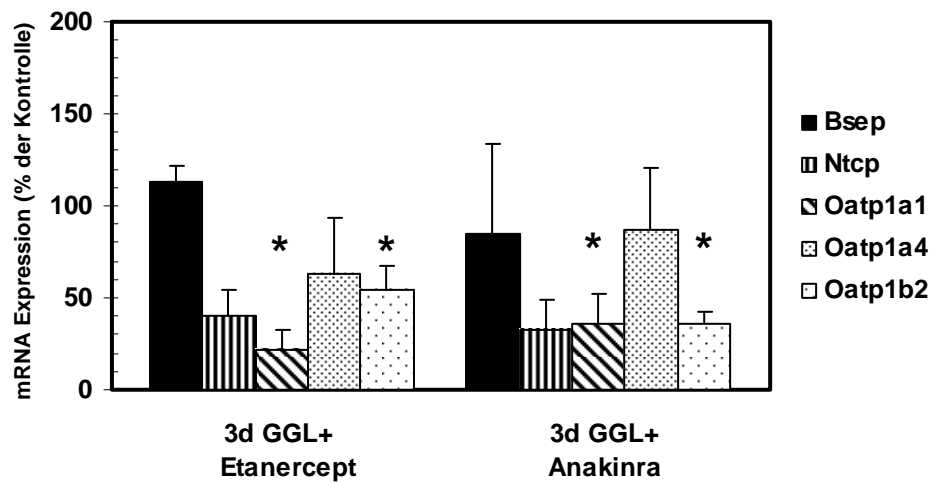
**Abb. 7 Real Time-PCR-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach Lipopolysaccharid-Gabe.** Die RNA von 3-4 Leberhomogenaten wurde isoliert und revers transkribiert. Die Genexpression von Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 wurde mittels Real Time-PCR bestimmt. Als interner Standard diente Hprt (\* $p < 0.05$  im Vergleich zu den Kontrolltieren).

### 4.1.3 mRNA-Expression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$ oder IL-1 $\beta$

Zur weiterführenden Untersuchung der Regulationsmechanismen von Gallensalz- und organischen Anionentransportern bei obstruktiver Cholestase wurden gallengangsligierte Ratten entweder mit dem TNF- $\alpha$ -Rezeptor-Fc-Fusionsprotein Etanercept oder mit dem IL-1 $\beta$ -Antagonisten Anakinra behandelt. Bei Behandlung mit Etanercept war nach 3 Tagen obstruktiver Cholestase die mRNA-Expression von *Bsep* ( $113 \pm 9\%$ ), *Ntcp* ( $40 \pm 14\%$ ) und *Oatp1a4* ( $63 \pm 30\%$ ) nicht signifikant verändert. Bei *Oatp1a1* und *Oatp1b2* war die mRNA-Expression signifikant herabreguliert ( $22 \pm 11\%$  bzw.  $54 \pm 13\%$ ;  $p < 0.05$  vs. Kontrolle).

Bei Behandlung mit dem IL-1 $\beta$ -Antagonisten Anakinra war die mRNA-Expression von *Oatp1a1* ( $36 \pm 16\%$ ) und *Oatp1b2* ( $36 \pm 6\%$ ) signifikant reduziert ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle). Die mRNA-Expression der übrigen Transporter war nicht signifikant verändert (Abb.8).

Bei Tieren mit obstruktiver Cholestase für 7 Tage, die mit Etanercept oder Anakinra vorbehandelt waren, konnte die mRNA-Expression der Transporter wegen der gleichzeitigen Regulation von *Hprt* nicht quantifiziert werden.



**Abb. 8 Real Time-PCR-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .** Die RNA von 3-4 Leberhomogenaten wurde isoliert und revers transkribiert. Die Genexpression von Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 wurde mittels Real Time-PCR gemessen. Als interner Standard diente Hprt (\* $p < 0.05$  im Vergleich zu den Kontrolltieren).



## 4.2 Western Blot

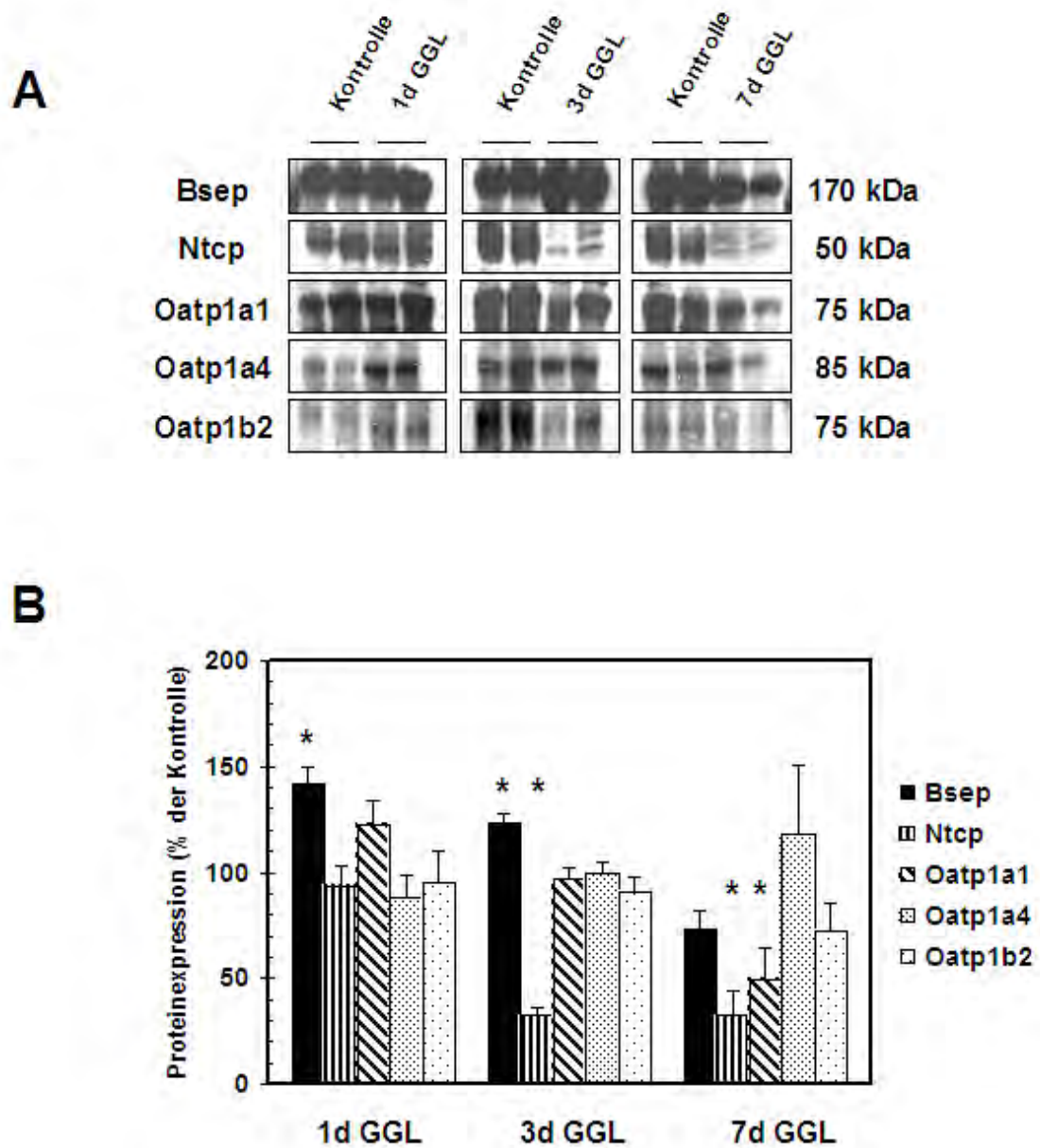
Für die Western Blot-Analyse wurden aus Leberproben Gesamtmembranen mittels Ultrazentrifugation präpariert. Nach Inkubation mit Laemmli-Puffer wurden die Proben mittels SDS-PAGE entsprechend ihres spezifischen Molekulargewichtes aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und im Anschluss daran mit einem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Die bestimmten Transportproteine wurden bei folgenden Molekulargewichten detektiert: Bsep bei 160 kDa, Ntcp bei 50 kDa, Oatp1a1 und Oatp1a4 bei ca. 75 kDa und Oatp1b2 bei 85 kDa.

### 4.2.1 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase

Zum Zeitpunkt 1d und 3d nach Gallengangsligatur kam es zu einem signifikanten Anstieg von Bsep auf  $142 \pm 9\%$  und  $123 \pm 5\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle). Die Proteinexpression von Ntcp war nach 3d und 7d signifikant reduziert ( $32 \pm 4\%$  bzw.  $33 \pm 11\%$ ;  $p < 0.05$  vs. Kontrolle).

Nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase war die Expression von Oatp1a1 signifikant vermindert ( $50 \pm 15\%$ ;  $p < 0.05$  vs. Kontrolle).

Die übrigen untersuchten Oatp-Isoformen wurden nicht signifikant reguliert (Abb.9).



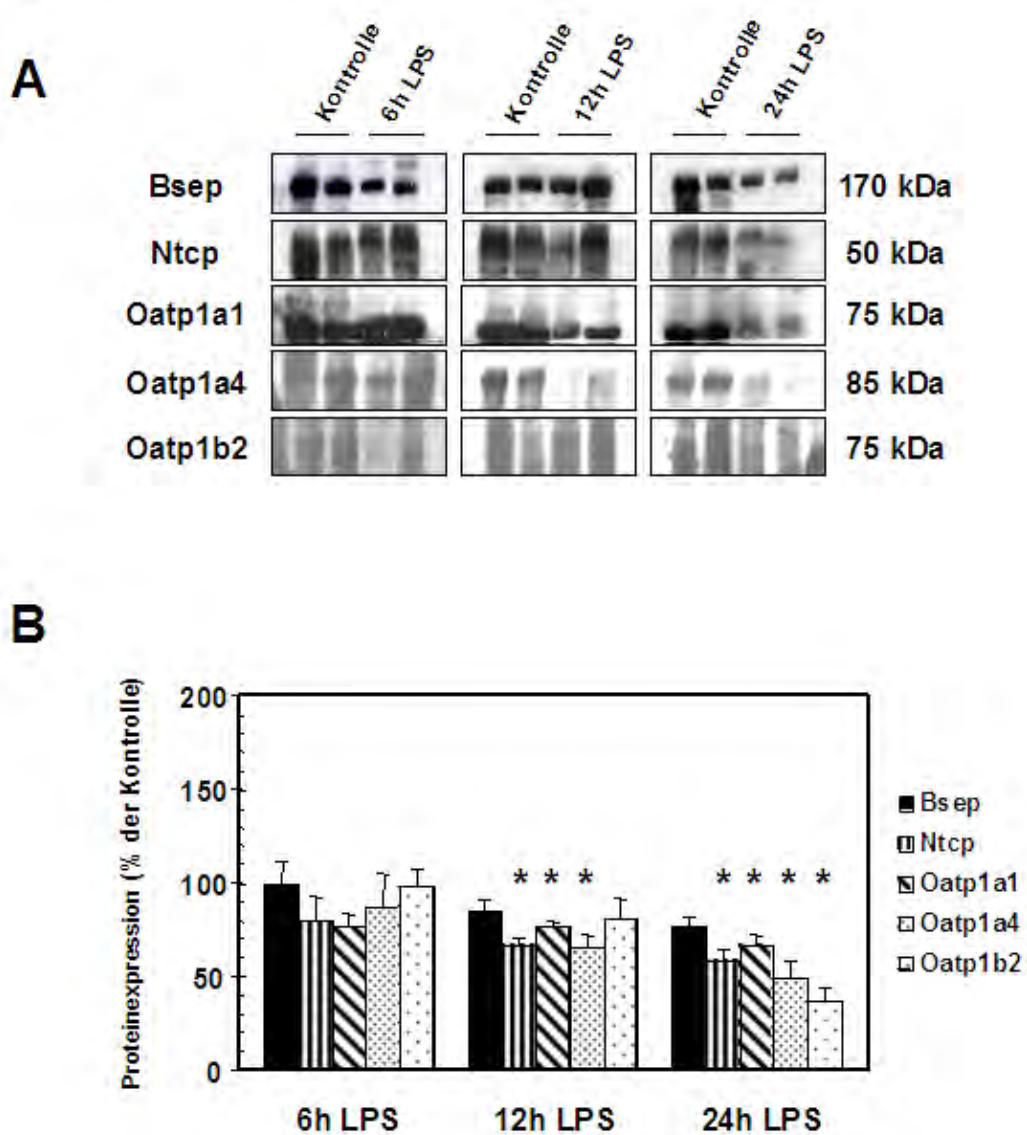
**Abb. 9 Immunoblot-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach obstruktiver Cholestase.** Nach obstruktiver Cholestase für 1d, 3d oder 7d wurde die Gesamt-Membranfraktion der Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert (A). Densitometrische Auswertung von 3-4 Proben pro Gruppe (\* $p < 0.05$  im Vergleich zu den Kontrolltieren) (B).

#### **4.2.2 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach Lipopolysacharid-Gabe**

Die Proteinexpression von Bsep lag nach 6h bei  $99 \pm 12\%$ , nach 12h bei  $84 \pm 7$  und nach 24h bei  $77 \pm 5\%$  (alle Werte nicht signifikant verändert).

Alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten Transportproteine wurden deutlich herabreguliert.

Zwölf Stunden nach LPS-Gabe war die Expression von Ntcp, Oatp1a1 und Oatp1a4 signifikant reduziert ( $67 \pm 4\%$ ,  $76 \pm 4\%$  und  $80 \pm 12\%$ ;  $p < 0.05$  vs. Kontrolle). 24 Stunden nach LPS-Gabe waren alle bestimmten Transporter signifikant herabreguliert (Ntcp  $58 \pm 6\%$ , Oatp1a1  $66 \pm 6\%$ , Oatp1a4  $49 \pm 9\%$  und Oatp1b2  $37 \pm 7\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) (Abb. 10).

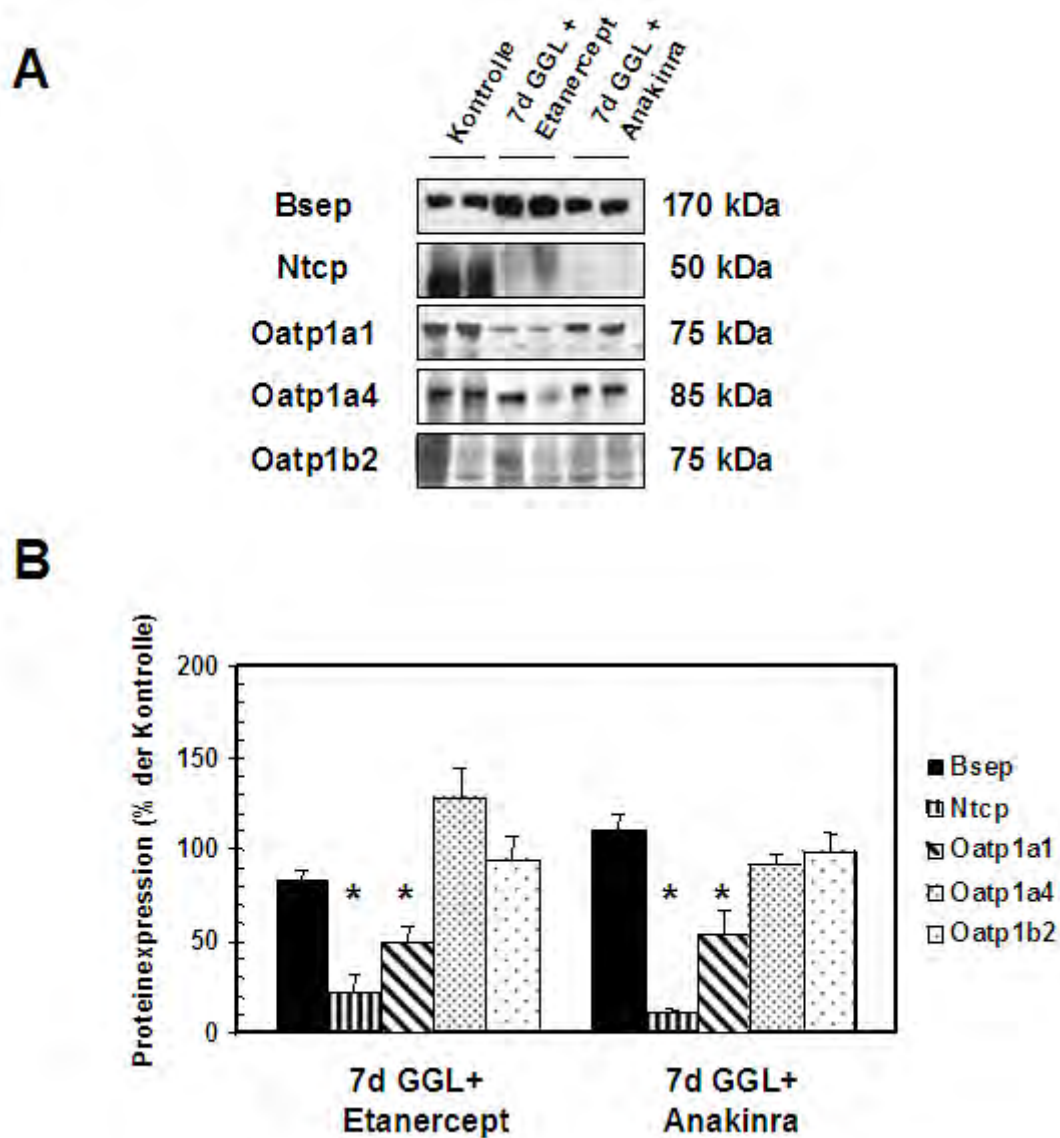


**Abb. 10 Immunoblot-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen nach Lipopolysaccharid-Gabe.** Nach Injektion von LPS bzw. NaCl (Kontrollreihe) und einem Zeitraum von 6h, 12h und 24h wurde die Gesamt-Membranfraktion der Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert (A). Densitometrische Auswertung von 3-4 Proben pro Gruppe (\* $p < 0,05$  im Vergleich zu den Kontrolltieren) (B).

### **4.2.3 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$ oder IL-1 $\beta$**

Bei Behandlung der gallengangsligierten Tiere mit einem TNF $\alpha$ -Antagonisten (Etanercept) über einen Zeitraum von 7d lag die Proteinexpression von Ntcp und Oatp1a1 bei  $22 \pm 10\%$  bzw.  $48 \pm 9\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle). Die Expression von Bsep, Oatp1a4 und Oatp1b2 ( $83 \pm 5\%$ ,  $129 \pm 16\%$  und  $95 \pm 13\%$ ) war nicht signifikant verändert.

Bei Verabreichung des IL-1 $\beta$ -Antagonisten Anakinra über einen Zeitraum von 7d lag die Proteinexpression von Bsep, Oatp1a4 und Oatp1b2 bei  $110 \pm 9\%$ ,  $91 \pm 6\%$  bzw.  $99 \pm 10\%$  (n.s.). Die Proteinexpression von Ntcp und Oatp1a1 lag bei  $11 \pm 2\%$  und  $54 \pm 13\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) (Abb. 11).



**Abb. 11 Immunoblot-Analyse von Bsep, Ntcp und Oatp-Isoformen obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .** 7d nach Ligatur des Gallengangs und Hemmung von IL-1 $\beta$  mit Etanercept bzw. TNF- $\alpha$  mit Anakinra wurde die Gesamt-Membranfraktion der Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert (A). Densitometrische Auswertung von 3-4 Proben pro Gruppe (\*p<0.05 im Vergleich zu den Kontrolltieren) (B).

### **4.3 Konfokale Laserscanningmikroskopie**

Die Lokalisation der Transporter Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 wurde mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden Gefrierschnitte von Leberproben mit dem entsprechenden Antiserum (K44, K4, K10, K15 oder K22) inkubiert und mit einem Cy3-gekoppelten Anti-Kaninchen IgG detektiert. Um die Zonierung der Transporter im Leber-Lobulus bestimmen zu können, wurde Glutaminsynthetase als Markerprotein für perizentrale Hepatozyten verwendet.

#### **4.3.1 Zonierte Regulation von hepatobiliären Transportern nach obstruktiver Cholestase**

Repräsentative Gewebeproben der Lebern von Tieren nach 1, 3 und 7 Tagen obstruktiver Cholestase wurden mit Antikörpern verschiedener Transporter inkubiert, mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie qualitativ und densitometrisch ausgewertet.

Nach drei Tagen obstruktiver Cholestase blieb die Expression und Lokalisation von Bsep und Ntcp in unmittelbarer Nähe der V. centralis erhalten, während in periportalen Hepatozyten eine verminderte Expression vorlag. Die Membransignale in periportalen Hepatozyten waren verbreitert. Im perimembranösen Zytoplasma kam es zu einer vermehrten Bildung immunoreaktiver Vesikel. Das Membransignal selbst erschien vergrößert (Abb. 12 und 13 C).

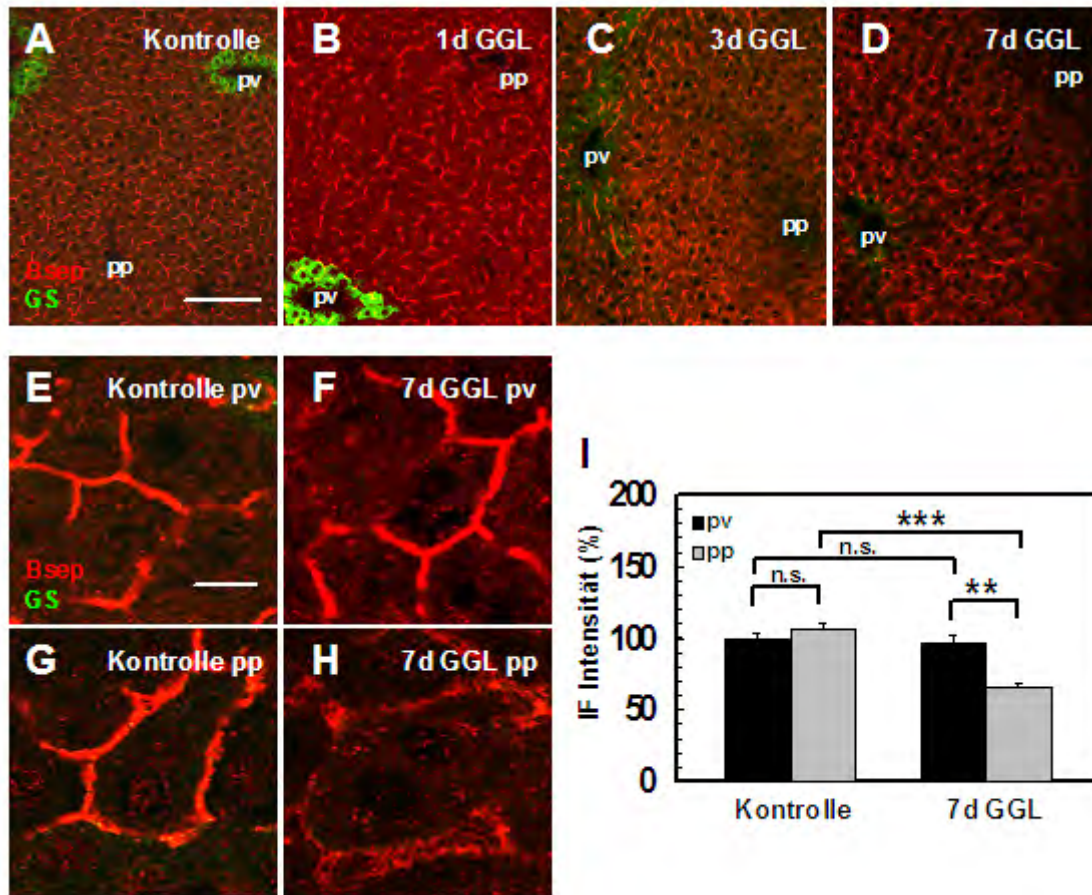
Am stärksten ausgeprägt waren die Veränderungen nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase. Die Densitometrie zeigte eine Reduktion des Membransignals von Bsep periportal auf  $66 \pm 4\%$  und von Ntcp auf  $67 \pm 7\%$  der Kontrollen (Abb. 12 und 13 D;  $p < 0.05$  vs. Kontrolle). Die Membransignale erschienen verbreitert und unscharf begrenzt. Im Zytoplasma zeigten sich immunoreaktive, vesikuläre Strukturen (Abb. 12 und 13 E-H).

Oatp1a1 wurde sowohl periportal als auch perivenös herabreguliert. Das Membransignal war in beiden Zonen nach 24 Stunden obstruktiver Cholestase reduziert. Nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase betrug die Membranintensität perivenös  $66 \pm 8\%$  und periportal  $57 \pm 6\%$  (Abb. 14).

Nach 24 Stunden obstruktiver Cholestase kam es bei dem zonierten Oatp1a4 (vgl. 1.4.2.2) zu einer Induktion der Transporterexpression in periportalen Hepatozyten. Nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase war die Zonierung von Oatp1a4 aufgehoben und im gesamten Leber-Lobulus war ein intensives Transportersignal zu erkennen. Ebenso zeigte sich nach 3 Tagen obstruktiver Cholestase eine zunehmende Expression von Oatp1a4 in Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten entlang den Zentralvenen. Die densitometrische Auswertung ergab eine Zunahme des Membransignals in dieser Zellpopulation von  $39 \pm 2\%$  auf  $93 \pm 11\%$  nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase. Während Oatp1a4 bei den Kontrolltieren in Hepatozyten der Zone 1 eine Signalintensität von  $48 \pm 6\%$  aufwies, fand sich bei den cholestatistischen Tieren eine Signalintensität von  $94 \pm 3\%$  (Abb. 15).

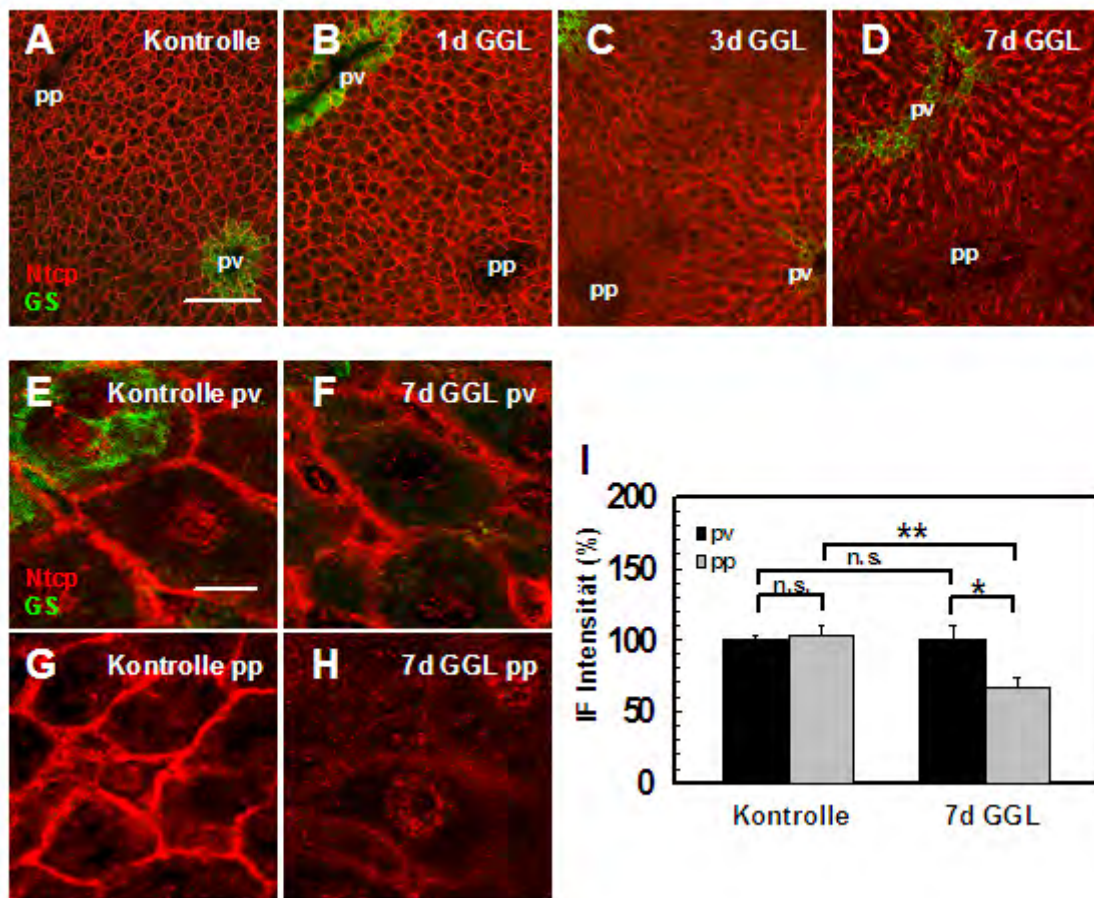
Das in der normalen Rattenleber periportal nur gering exprimierte Oatp1b2 wurde nach 24 Stunden obstruktiver Cholestase in Hepatozyten der Zone 1 induziert. Nach 7 Tagen hatte die Intensität des Membransignals auf  $92 \pm 5\%$  zugenommen. Oatp1a4 und Oatp1b2 waren somit nach 7 Tagen Cholestase lobulär homogen verteilt (Abb. 15 und 16).





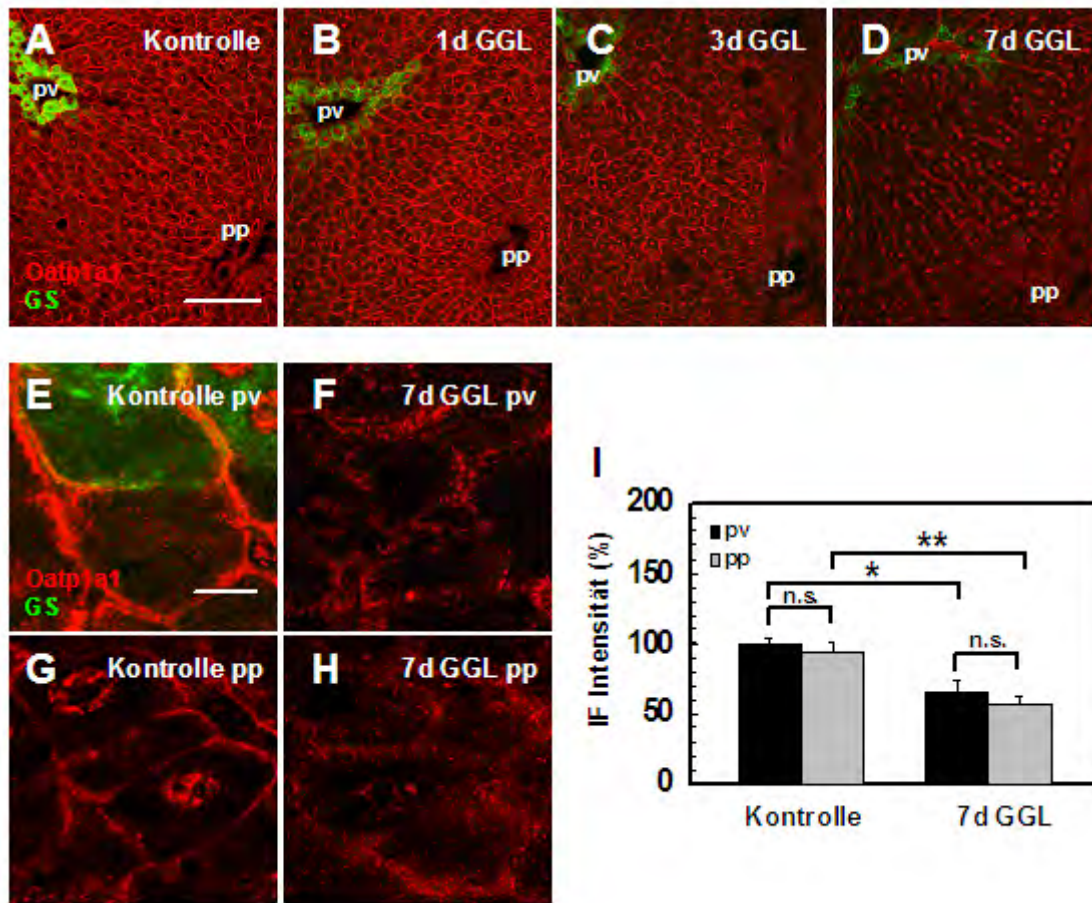
**Abb. 12 Lokalisation von Bsep nach obstruktiver Cholestase.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K44) gegen Bsep (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert (A, Kontrolle; B, 1d GGL; C, 3d GGL; D, 7d GGL; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 7d GGL pv; G, Kontrolle pp; H, 7d GGL pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; GGL, Gallengangsligatur).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; n.s. nicht signifikant).



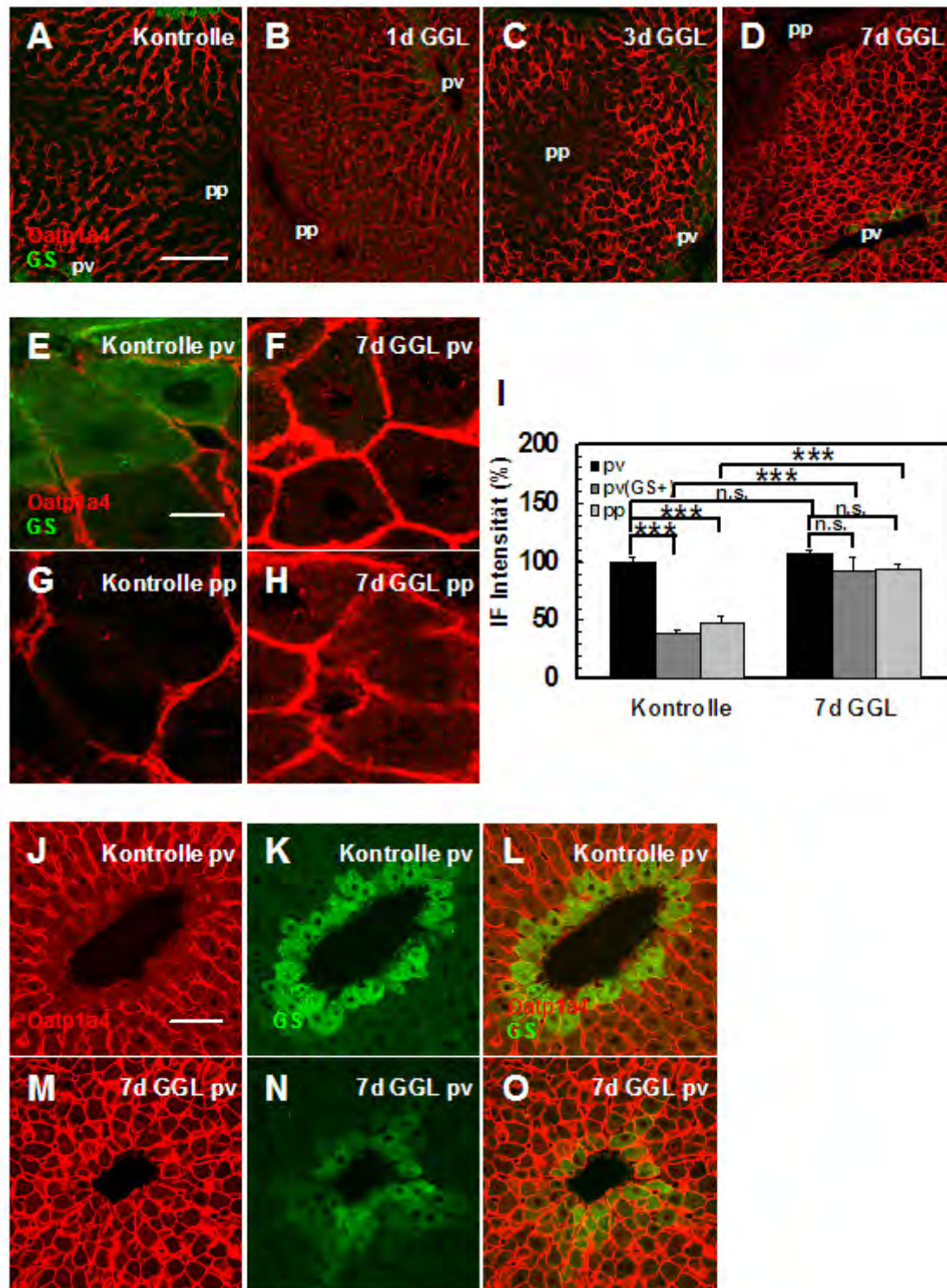
**Abb. 13 Lokalisation von Ntcp nach obstruktiver Cholestase.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K4) gegen Ntcp (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert (A, Kontrolle; B, 1d GGL; C, 3d GGL; D, 7d GGL; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 7d GGL pv; G, Kontrolle pp; H, 7d GGL pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; GGL; Gallengangsligatur).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; n.s. nicht signifikant).

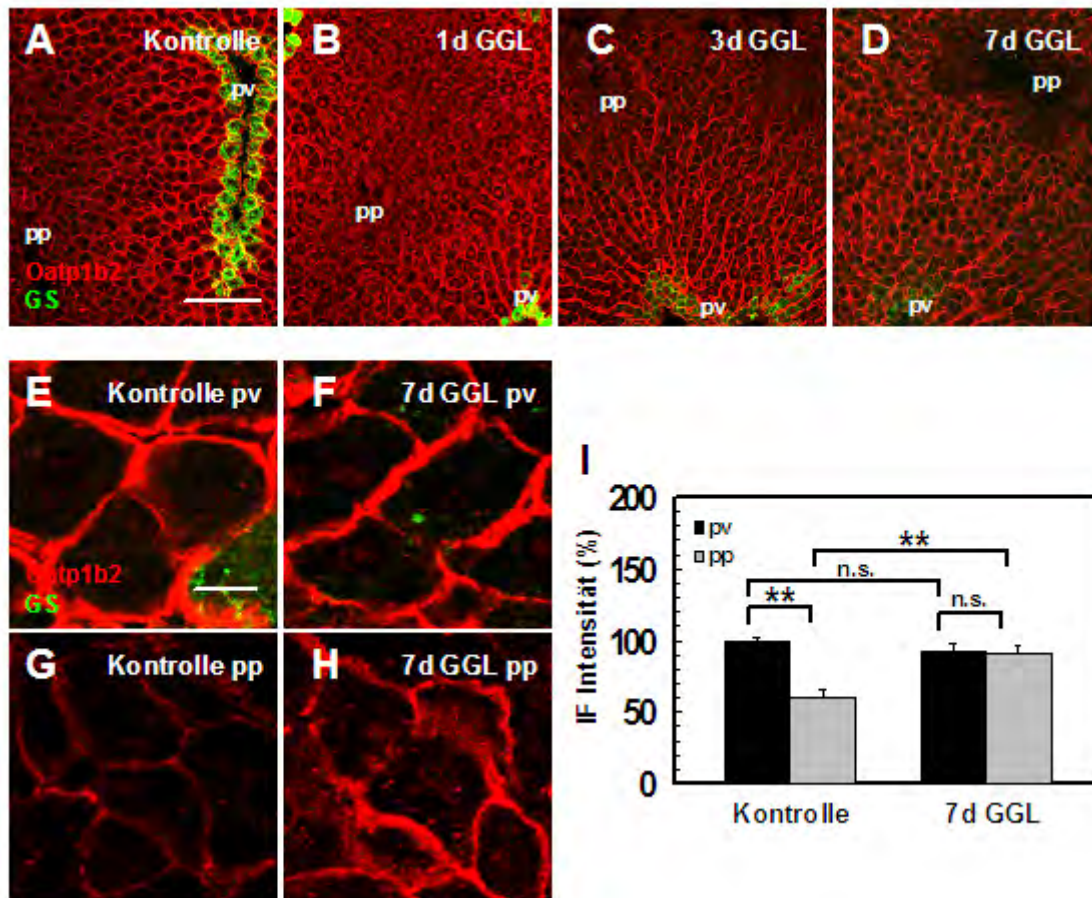


**Abb. 14 Lokalisation von Oatp1a1 nach obstruktiver Cholestase.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K10) gegen Oatp1a1 (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert (A, Kontrolle; B, 1d GGL; C, 3d GGL; D, 7d GGL; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 7d GGL pv; G, Kontrolle pp; H, 7d GGL pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; GGL, Gallengangsligatur).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; n.s. nicht signifikant).



**Abb. 15 Lokalisation von Oatp1a4 nach obstruktiver Cholestase.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K15) gegen Oatp1a4 (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert (A, Kontrolle; B, 1d GGL; C, 3d GGL; D, 7d GGL Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 7d BDL pv; G, Kontrolle pp; H, 7d BDL pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; J-L, Kontrolle pv; M-O, 7d GGL pv; Balken J-O entspricht 50  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; GGL, Gallengangsligatur). Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I, \*\*\* $p$ ≤0.001; n.s. nicht signifikant).



**Abb. 16 Lokalisation von Oatp1b2 nach obstruktiver Cholestase.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K22) gegen Oatp1b2 (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert (A, Kontrolle; B, 1d GGL; C, 3d GGL; D, 7d GGL; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 7d GGL pv; G, Kontrolle pp; H, 7d GGL pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; GGL, Gallengangsligatur).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I, \*\* $p \leq 0.01$ ; n.s. nicht signifikant).

#### **4.3.1.1 Effekte der Hemmung von TNF- $\alpha$**

Die Intensität und Struktur des kanalikulären Membransignals des Bsep blieb nach 7-tägiger obstruktiver Cholestase und Behandlung mit Etanercept in periportalen und perizentralen Hepatozyten weitgehend erhalten. Die Densitometrie der perizentralen und periportalen kanalikulären Membranen ergab ein Membransignal von  $100 \pm 5\%$  bzw.  $96 \pm 5\%$ . Das Membransignal erschien in allen drei Zonen klar und deutlich abgegrenzt, jedoch breiter als bei den Kontrolltieren (Abb. 17).

Die Intensität der Immunfluoreszenz von Ntcp und Oatp1a1 blieb nach Hemmung von TNF- $\alpha$  deutlich reduziert. Die Signalintensität des Natrium-Taurocholat-Cotransporting-Polypeptids war periportal auf  $50 \pm 3\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) reduziert, während die Signalintensität der Immunfluoreszenz perizentral weitgehend unverändert blieb ( $92 \pm 5\%$ , nicht signifikant). Die Signalintensität des Oatp1a1 war periportal und perizentral reduziert (perivenös  $84 \pm 2\%$ , periportal  $76 \pm 3\%$ ) (Abb. 18).

Die Hemmung von TNF- $\alpha$  hatte keinen Einfluss auf die periportale Induktion von Oatp1a4 und Oatp1b2 bei obstruktiver Cholestase. Die Intensität der Immunfluoreszenz von Oatp1a4 nahm in periportalen Hepatozyten von  $35 \pm 4\%$  auf  $77 \pm 4\%$  und in perivenösen, Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten von  $34 \pm 4\%$  auf  $82 \pm 5\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) zu. Die Intensität der Immunfluoreszenz von Oatp1b2 nahm periportal von  $46 \pm 3\%$  auf  $85 \pm 4\%$  zu (Abb. 18).

#### **4.3.1.2 Effekte der Hemmung von IL-1 $\beta$**

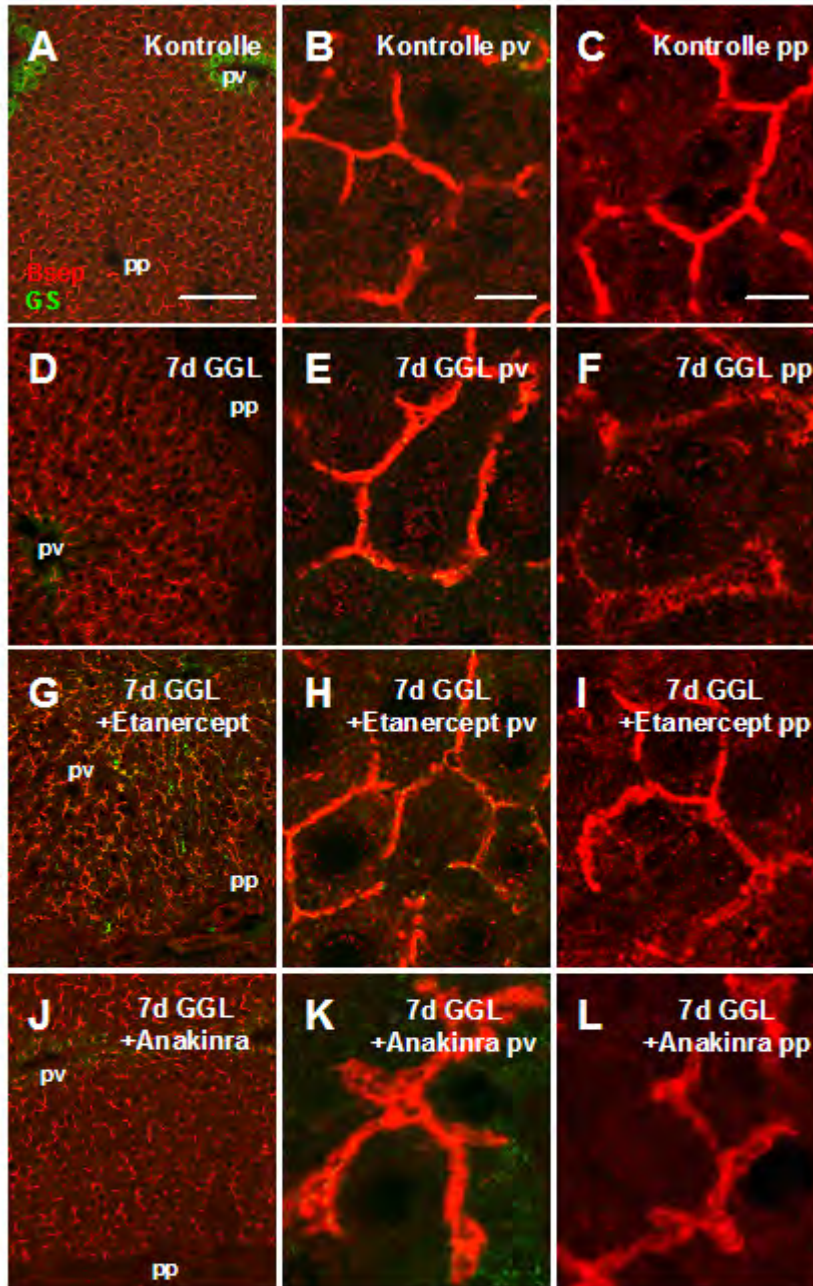
Das Membransignal von Bsep unterschied sich in cholestatischen, mit Anakinra behandelten Tieren nur minimal von den Kontrolltieren. Die kanalikuläre Signalintensität bei den behandelten Tieren erreichte perivenös  $105 \pm 3\%$  und periportal  $99 \pm 3\%$  (nicht signifikant, Abb. 17).

Die zonierte Regulation von Ntcp bei obstruktiver Cholestase war nach Hemmung von IL-1 $\beta$  unverändert. Die Intensität der Immunfluoreszenz in perizentralen Hepatozyten blieb deutlich reduziert ( $38 \pm 2\%$ ;  $p < 0.001$  vs. Kontrolle). Es kam in diesem Bereich zu einer Verbreiterung der basolateralen Membranen und einer Zunahme von submembranös gelegenen, Ntcp-positiven Vesikeln (Abb. 18).

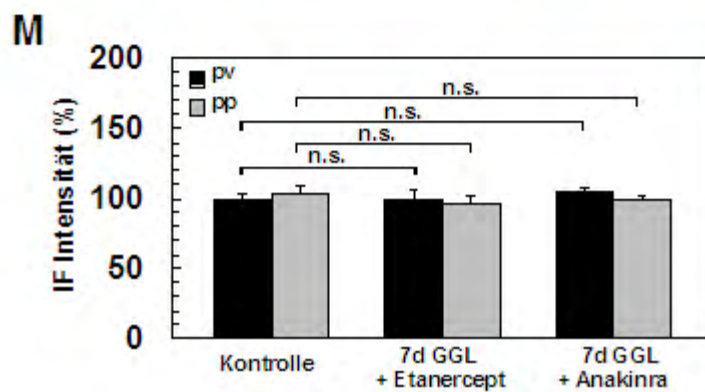
Die Immunfluoreszenzintensität des Oatp1a1 fiel perivenös auf  $65 \pm 2\%$  und periportal auf  $61 \pm 3\%$  ( $p < 0.001$  vs. Kontrolle) ab (Abb. 18).

Der Oatp1a4 wurde, wie auch unter obstruktiver Cholestase, in Bereichen mit niedriger Expression induziert. Die Expression in perivenösen Glutamin-positiven Hepatozyten stieg auf  $108 \pm 3\%$ , die Signalintensität von Oatp1a4 der Membranen perivenöser, Glutaminsynthetase-positiver Hepatozyten stieg auf  $105 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$  vs. Kontrolle) an. In periportalen Hepatozyten stieg die Membranintensität auf  $104 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$  vs. Kontrolle) (Abb. 18).

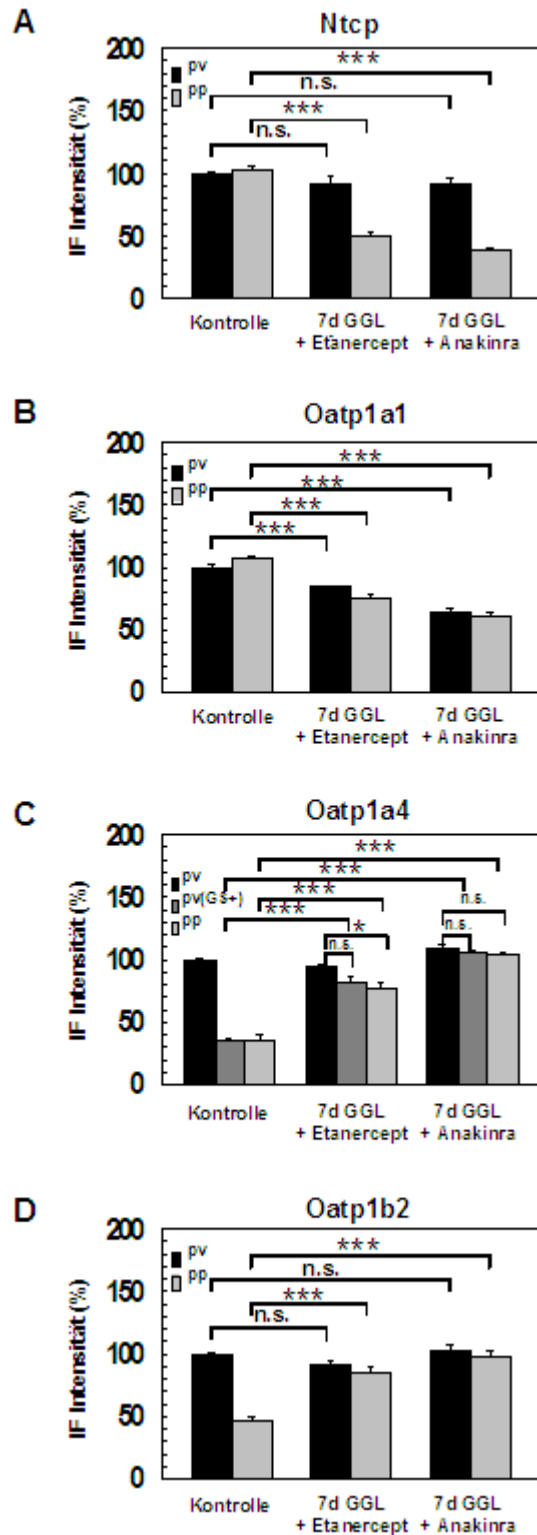
Der Oatp1b2 wurde in der Zone 1 induziert, so dass die Expression nach 7d unter obstruktiver Cholestase lobulär homogen verteilt war. Die perivenöse Signalintensität blieb unverändert ( $103 \pm 2\%$ , nicht signifikant), die periportale Signalintensität nahm zu ( $97 \pm 5\%$ ;  $p < 0.001$  vs. Kontrolle) (Abb. 18).



**Abb.17 Lokalisation von Bsep in der Rattenleber bei obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K44) gegen Bsep (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutamin-Synthetase (grün) zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert (A, Kontrolle; B, Kontrolle pv; C, Kontrolle pp; D, 7d GGL; E, 7d GGL pv; F, 7d GGL pp; G, 7d GGL+Etanercept; H, 7d GGL+Etanercept pv; I, 7d GGL+Etanercept pp; J, 7d GGL+Anakinra; K, 7d GGL+Anakinra pv; L, 7d GGL+Anakinra pp; Balken A, D, G, J entspricht 100  $\mu$ m; Balken in B, C, E, F, H, I, K, L entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; GGL, Gallengangsligatur). Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen gemessen (M; n.s. nicht signifikant).







**Abb. 18** Quantitative Immunfluoreszenz von Ntcp und von Oatp-Isoformen in der Rattenleber nach obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Die Daten drücken das Verhältnis der maximalen Signalintensität der Membranen zu den perizentralen Hepatozytenmembranen der Kontrolltiere aus. Es wurden jeweils 4 Tiere pro Gruppe untersucht und je 10 Membranen/Tier perivenös und periportal ausgewertet. (A-D, n.s. nicht signifikant; \* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

### 4.3.2 Zonierung von hepatobiliären Transportern nach Lipopolysaccharid-Gabe

Gefrierschnitte der Lebern von Tieren 6h, 12h und 24h nach Injektion von Lipopolysaccharid wurden mit Antikörpern gegen verschiedene hepatobiliäre Transporter inkubiert. Nach konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurden die Membransignale densitometrisch ausgewertet.

Die ersten Veränderungen der Lokalisation hepatobiliärer Transporter waren 6h nach Applikation des Endotoxins zu beobachten. Diese Veränderungen waren nach 24h am deutlichsten ausgeprägt.

Die Expression von Bsep wurde herabreguliert. Dies erfolgte in periportalen Hepatozyten etwas stärker ( $54 \pm 2\%$ ;  $p < 0.001$  vs. Kontrolle), als in perivenösen Hepatozyten. Das kanalikuläre Membransignal von Bsep war in der Nähe der Periportalfelder unscharf und verbreitert zu erkennen. Im Zytoplasma traten vermehrt vesikuläre Strukturen auf (Abb. 19).

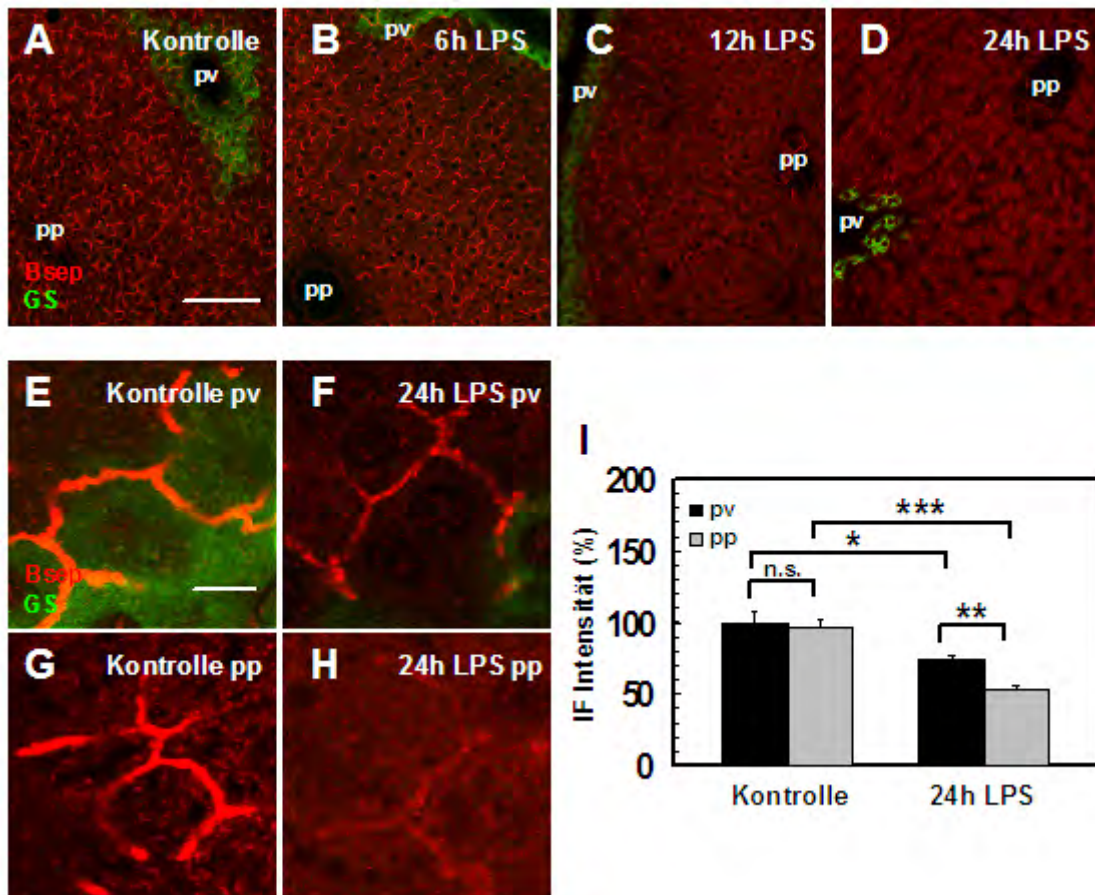
Die Signalintensität des Natrium-abhängigen Transportersystems Ntcp nahm über 24h sowohl periportal, als auch perizentral kontinuierlich ab und erreichte eine Signalintensität von jeweils  $48 \pm 4\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) (Abb. 20).

Oatp1a1 war 24h nach LPS-Gabe weiterhin homogen über den Leber-Lobulus verteilt. Im Bereich des Periportalfeldes kam es zu einem signifikanten Abfall der Immunfluoreszenzintensität auf  $62 \pm 3\%$  ( $p < 0.001$  vs. Kontrolle), in der Nähe der Zentralvene auf  $61 \pm 1\%$  ( $p < 0.001$  vs. Kontrolle). Das basolaterale Membransignal war verbreitert. Es kam zu einer Zunahme von immunreaktiven Vesikeln im Zytoplasma der Hepatozyten (Abb. 21).

Die Zonierung des Oatp1a4 blieb über den gesamten Zeitraum nach Lipopolysaccharid-Gabe erhalten. Das Membransignal war zum Zeitpunkt 24h nach LPS-Injektion perivenös auf  $78 \pm 3\%$  ( $p < 0.001$  vs. Kontrolle) und periportal auf  $46 \pm 1\%$  ( $p < 0.001$  vs. Kontrolle) reduziert. Die Expression des Proteins in Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten blieb unverändert (Abb. 22).

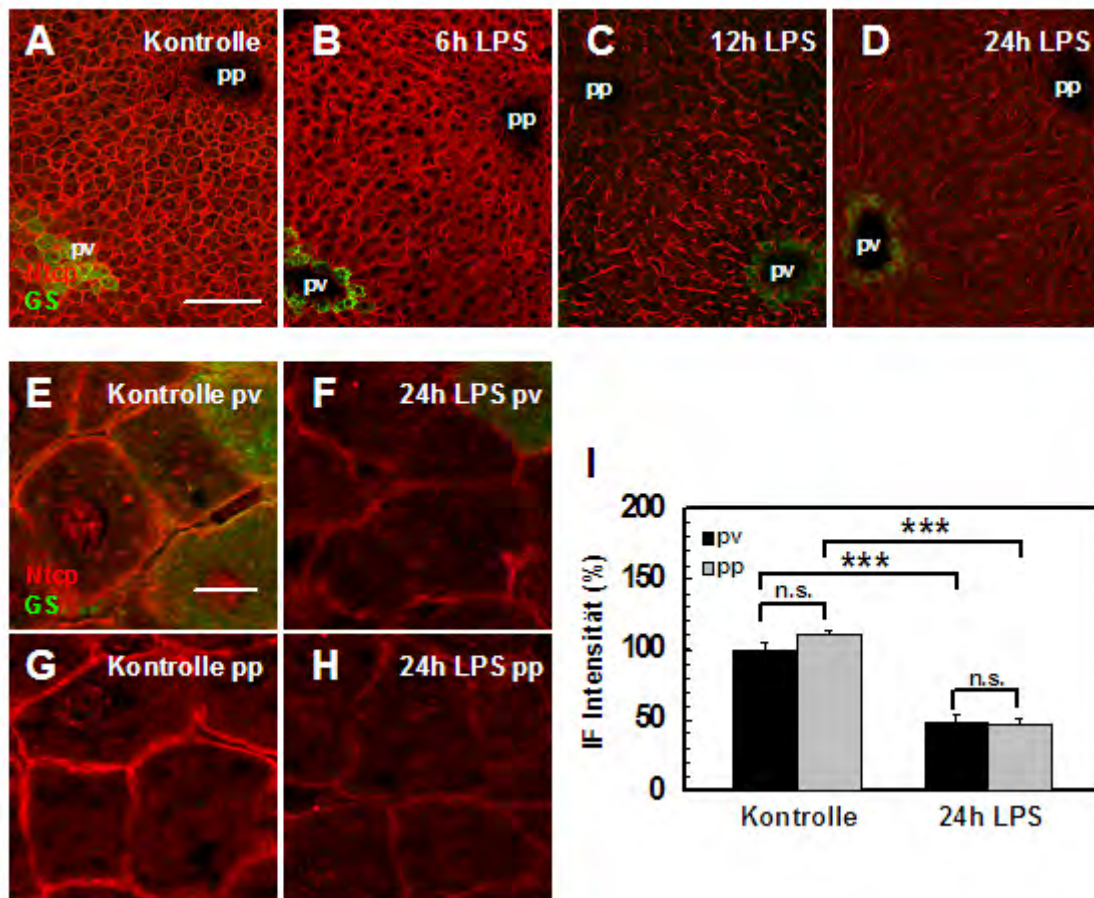
Die Signalintensität von Oatp1b2 war nach LPS-Gabe in den Zonen 1, 2 und 3 zunehmend reduziert. 24 Stunden nach LPS-Gabe war die Signalintensität in

perivenösen Hepatozyten auf  $75 \pm 6\%$  ( $p < 0.01$  vs. Kontrolle) und in periportalen Hepatozyten auf  $29 \pm 1\%$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) vermindert. Im Zytoplasma der Hepatozyten waren vermehrt immunoreaktive vesikuläre Strukturen darstellbar. Die Membransignale waren verbreitert (Abb. 23).



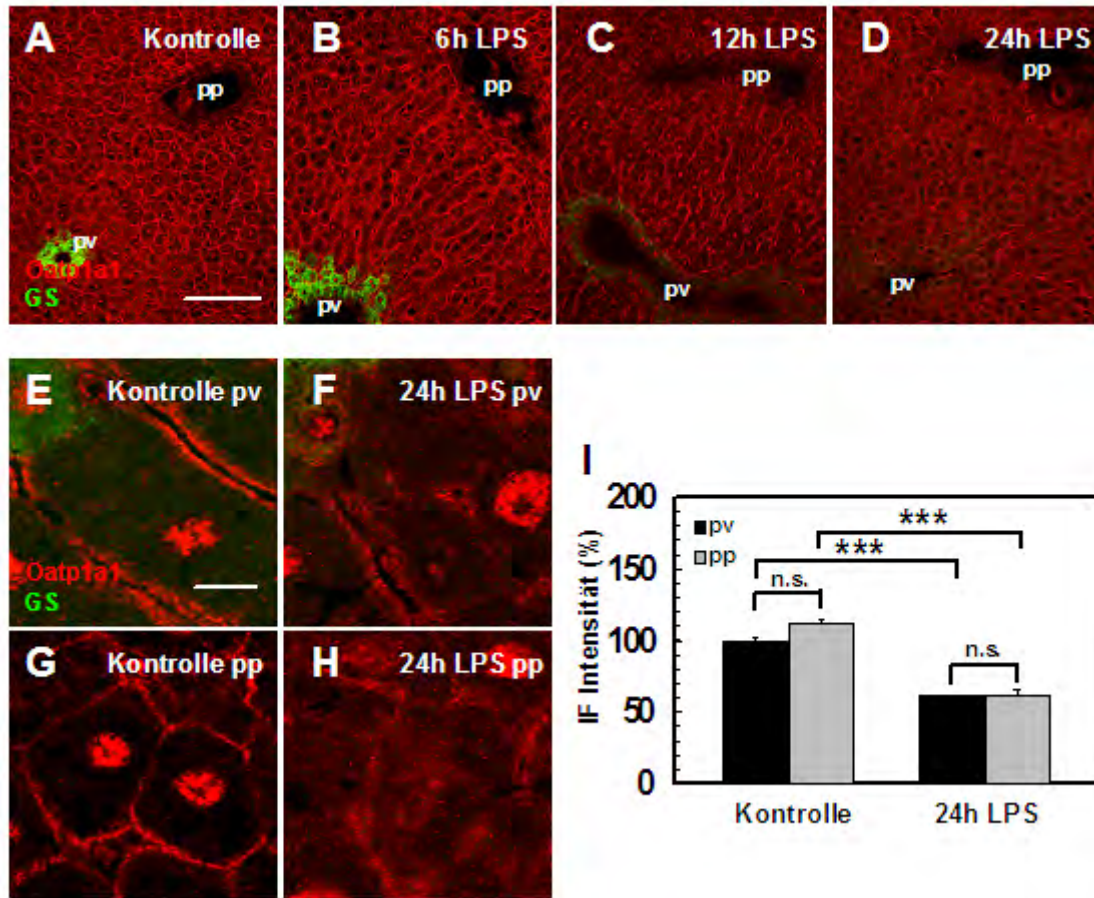
**Abb. 19 Quantitative Immunfluoreszenz von Bsep nach Lipopolysaccharid-Gabe.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K44) gegen Bsep (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert. (A, Kontrolle; B, 6h LPS; C, 12h LPS; D, 24h LPS; Balken A-D entspricht 100  $\mu\text{m}$ ; E, Kontrolle pv; F, 24h LPS pv; G, Kontrolle pp; H, 24h LPS pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu\text{m}$ ; pv, perivenös; pp, periportal; LPS, Lipopolysaccharid-Gabe).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I, \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; n.s. nicht signifikant).



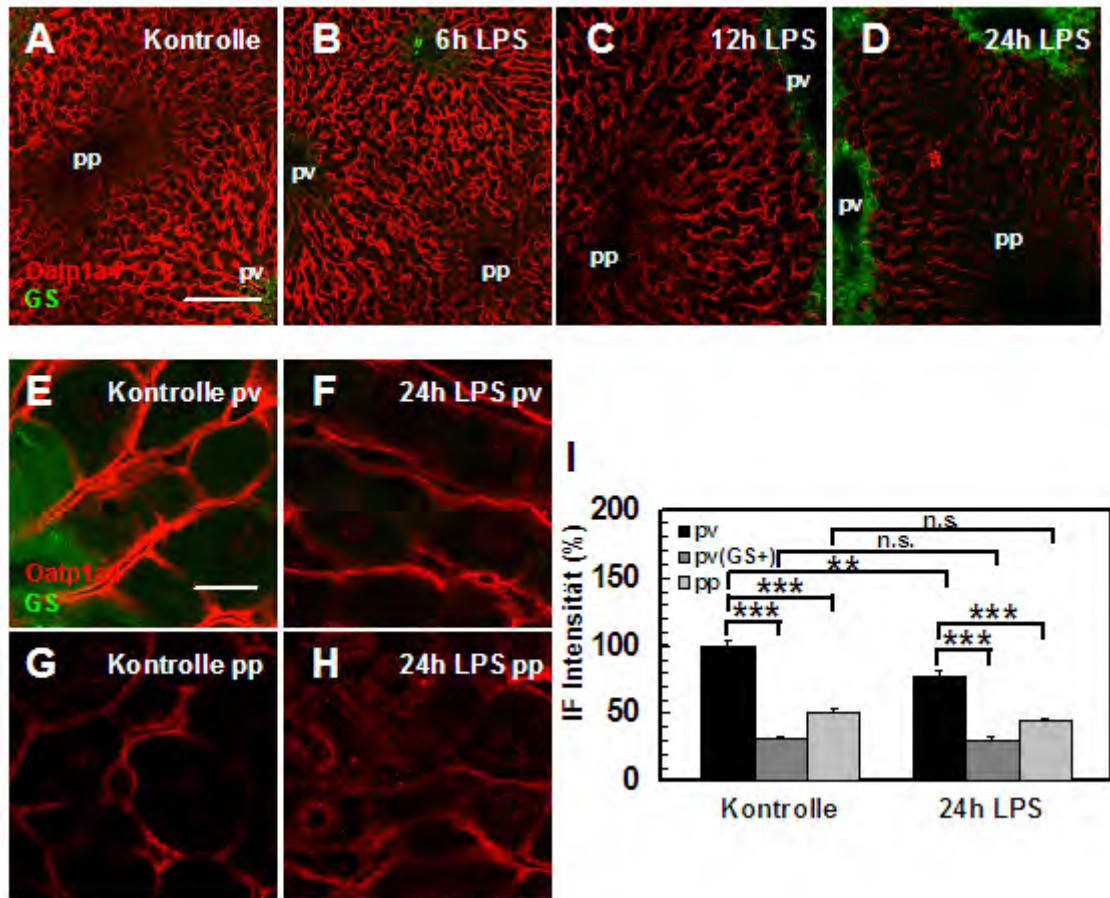
**Abb. 20** Quantitative Immunfluoreszenz von Ntcp nach Lipopolysaccharid-Gabe. Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K4) gegen Ntcp (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert. (A, Kontrolle; B, 6h LPS; C, 12h LPS; D, 24h LPS; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 24h LPS pv; G, Kontrolle pp; H, 24h LPS pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; LPS, Lipopolysaccharid-Gabe).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I, \*\*\* $p$ <0.001, n.s. nicht signifikant).



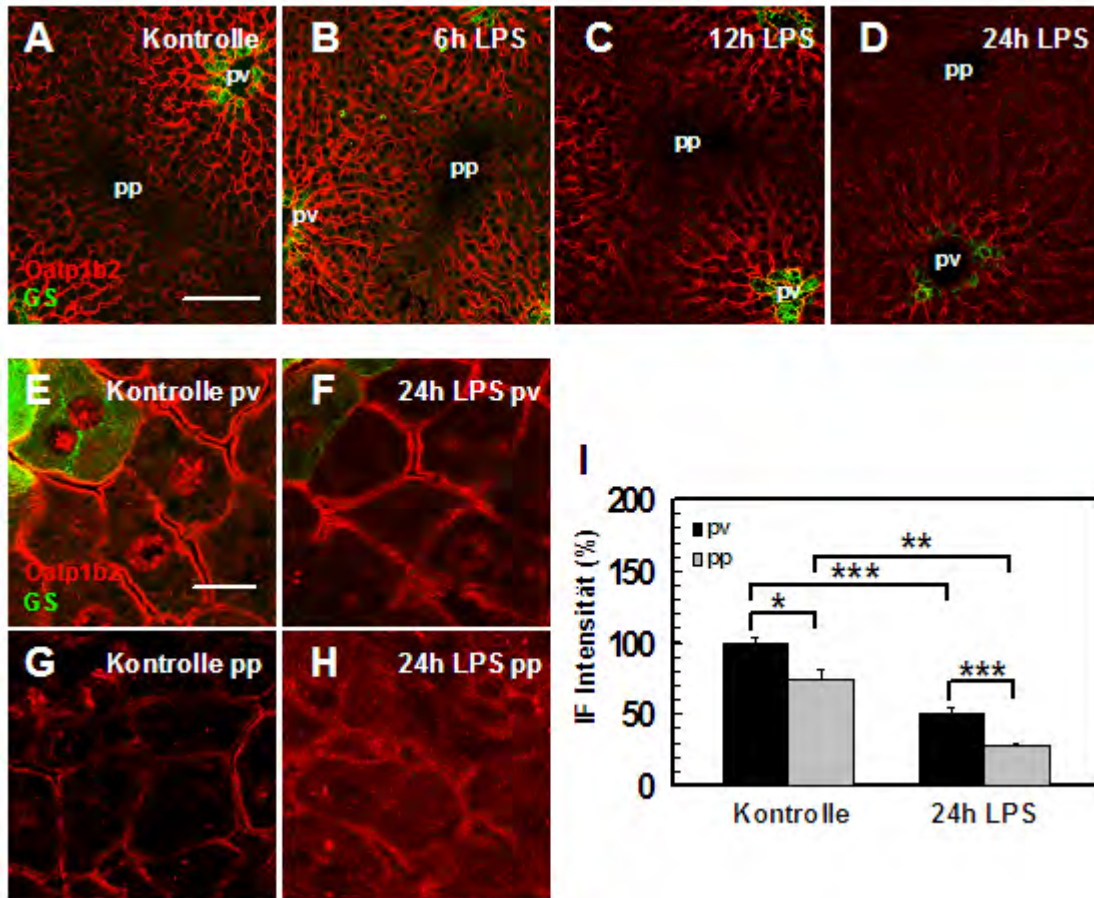
**Abb. 21 Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a1 nach Lipopolysaccharid-Gabe.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K10) gegen Oatp1a1 (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert. (A, Kontrolle; B, 6h LPS; C, 12h LPS; D, 24h LPS; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 24h LPS pv; G, Kontrolle pp; H, 24h LPS pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; LPS, Lipopolysaccharid-Gabe).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I, \*\*\* $p \leq 0.001$ ; n.s. nicht signifikant).



**Abb. 22 Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a4 nach Lipopolysaccharid-Gabe.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K15) gegen Oatp1a4 (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert. (A, Kontrolle; B, 6h LPS; C, 12h LPS; D, 24h LPS; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F, 24h LPS pv; G, Kontrolle pp; H, 24h LPS pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; LPS, Lipopolysaccharid-Gabe).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I, \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; n.s. nicht signifikant).



**Abb. 23 Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1b2 nach Lipopolysaccharid-Gabe.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper (K22) gegen Oatp1b2 (rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) zur Detektion der perizentralen Hepatozyten markiert. (A, Kontrolle; B, 6h LPS; C, 12h LPS; D, 24h LPS; Balken A-D entspricht 100  $\mu$ m; E, Kontrolle pv; F 24h LPS pv; G, Kontrolle pp; H, 24h LPS pp; Balken E-H entspricht 10  $\mu$ m; pv, perivenös; pp, periportal; LPS, Lipopolysaccharid-Gabe).

Für die densitometrische Auswertung wurden von je 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und der periportal Leberzellen bestimmt (I, \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

### **4.3.3 Lobuläre Verteilung der proinflammatorischen Reaktionen nach obstruktiver Cholestase und nach Lipopolysaccharid-Gabe**

#### **4.3.3.1 Kupferzellen**

Die Kupferzellen in der Leber sind gewebetypische Makrophagen und gehören somit zu den mononukleären Zellen. Sie sind vor allem an den Wandungen der Sinusoide vorzufinden und extrahieren aus dem Blut körpereigene und fremde Substanzen durch Phagozytose. In normaler Rattenleber fand sich ein Überwiegen von Kupferzellen in der Nähe des Periportalfeldes (Abb. 24 A). Sowohl nach obstruktiven Cholestase (Abb. 24 B), als auch nach Behandlung mit Lipopolysaccharid (Abb. 24 C) blieb die zonale Heterogenität bestehen.

#### **4.3.3.2 Myeloperoxidase-positive Zellen**

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Hämoprotein, welches ein Molekulargewicht von 140 kDa aufweist und aus 4 Untereinheiten besteht. Es ist in den neutrophilen, polymorphkernigen Granulozyten (Leukozyten) in hoher Konzentration vorhanden und katalysiert aus Chloridionen und Wasserstoffperoxid die Bildung von HOCl, welches als starkes Oxidationsmittel wirkt. Im Lebergewebe der Kontrolltiere waren nur vereinzelt Myeloperoxidase-positive Zellen zu beobachten (Abb. 24 D).

Nach obstruktiver Cholestase wurden diese Zellen im Periportalfeld und in der Zone 1 rekrutiert, während in der Zone 3 weiterhin nur einzelne neutrophile Granulozyten nachweisbar waren (Abb. 24 E).

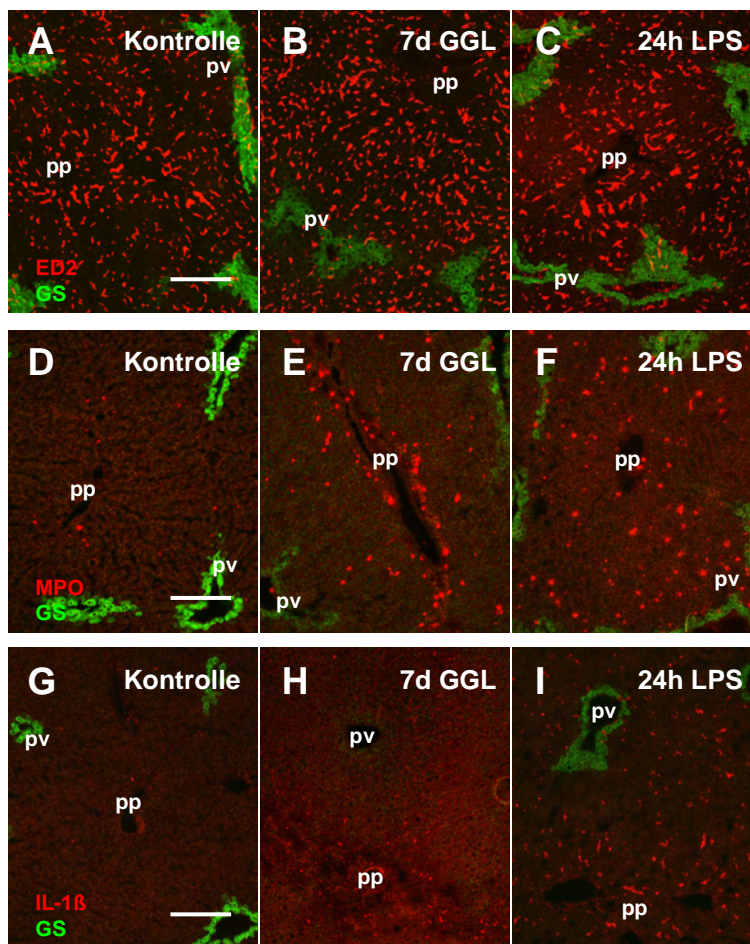
Nach Gabe von Lipopolysaccharid kam es zu einer deutlichen Zunahme der Myeloperoxidase-positiven Zellen. Die Zellen waren gleichmäßig über den gesamten Leberazinus verteilt (Abb. 24 F).



#### 4.3.3.3 Interleukin 1 $\beta$

Interleukin 1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Enzym, das über die Induktion von IL-8 und RANTES eine Chemotaxis von Granulozyten induziert. Dieses aus 153 Aminosäuren bestehende Protein wird vorwiegend von Monozyten (z.B. von aktivierten Kupfferzellen in der Leber) synthetisiert und sezerniert. Nach obstruktiver Cholestase wurde IL-1 $\beta$  vermehrt in der Nähe der Periportalfelder und der Zone 1 exprimiert, während in unmittelbarer Nähe der V. centralis nur vereinzelt IL-1 $\beta$ -positive Signale zu erkennen waren (Abb. 24 H).

Die Behandlung mit Lipopolysaccharid führte zu einer homogenen azinären Verteilung von IL-1 $\beta$  (Abb. 24 I).



**Abb. 24 Lokalisation von Kupfferzellen, neutrophilen Granulozyten und von IL-1 $\beta$  in der Leber nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase und 24 Stunden nach LPS-Gabe.** Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Kupfferzellen (A-C), Myeloperoxidase-positive Zellen (D-F) bzw. IL-1 $\beta$  (G-I) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase immunhistochemisch angefärbt. Die lobuläre Lokalisation der Kupfferzellen war in verschiedenen Gruppen nicht unterschiedlich ausgeprägt. Bei obstruktiver Cholestase fand sich eine periportal betonte Verteilung von polymorphkernigen Granulozyten und IL-1 $\beta$ , während die lobuläre Verteilung nach LPS-Gabe homogen war (A, D, G; Kontrollen; B, E, H; 7d GGL; C, F, I; 24h LPS; Balken in A-I entspricht 100  $\mu$ m).

## 5 Diskussion

Die Regulation von hepatobiliären Transportproteinen nach verschiedenen cholestatischen Stimuli führt zur Induktion und Perpetuierung einer Cholestase. Veränderungen der Expression von Transportproteinen bei Cholestase sind aber auch Ausdruck von adaptiven Veränderungen, die die Exkretion von cholephilen Substanzen über alternative Wege fördern und dazu dienen soll, den cholestatischen Leberschaden zu reduzieren. Frühere Studien zeigten, dass die inverse Regulation von Mrp2 und Mrp3 bei obstruktiver Cholestase auch auf zellulärer Ebene stattfindet und stellten die Hypothese auf, dass verschiedene Hepatozyten-Populationen unterschiedlich auf cholestatische Stimuli reagieren (Paulusma et al. 2000, Donner und Keppler 2001, Soroka et al. 2001, Lee et al. 2001, Donner et al. 2004). Hieraus lässt sich schließen, dass sowohl das Ausmaß als auch die Kompensationsmechanismen einer Cholestase in verschiedenen Hepatozyten-Populationen unterschiedlich ausgeprägt sind. Ferner lassen sich durch Erkenntnisse der Zonierung weitere Schlussfolgerungen über Regulationsmechanismen von hepatobiliären Transportern ableiten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde erarbeitet, dass weitere Gallensalz- und organische Anionentransporter zellulären Regulationsmechanismen unterliegen.

Im Tiermodell der obstruktiven Cholestase wurde eine koordinierte Herabregulation von Bsep und Ntcp in der Plasmamembran der periportal gelegenen Hepatozyten beobachtet. In derselben Hepatozyten-Population kam es zu einem Anstieg der Expression des Oatp1a4 und Oatp1b2. Oatp1a4 wurde dabei auch in der Plasmamembran von Glutaminsynthetase-positiven Leberzellen induziert, die unter physiologischen Bedingungen dieses Transportprotein nur sehr gering exprimieren.

Mögliche Effektoren, die zu einer Zonierung dieser Transporter führen können wurden untersucht. Nach obstruktiver Cholestase kam es zu einer Rekrutierung der neutrophilen, polymorphkernigen Leukozyten in Periportalfeldern und in der Zone 1. Des Weiteren wurde in diesen Bereichen eine vermehrte Expression von IL-1 $\beta$  beobachtet. Die Inhibition der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  verhinderte weitgehend die Herabregulation von Bsep in Hepatozyten der Zone 1.

### **Hemmung der periportalen Herabregulation von Bsep durch Inhibition von TNF- $\alpha$ oder IL-1 $\beta$**

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass die Proteinexpression von Bsep bei obstruktiver Cholestase weitgehend erhalten bleibt (Lee et al. 2000). Die Expression in verschiedenen Hepatozyten-Populationen wurde jedoch bisher nicht untersucht.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in Plasmamembranen der Hepatozyten der Zone 1 eine deutliche Herabregulation von Bsep stattfindet. Das Erscheinen intrazellulärer, submembranöser und vesikulärer Strukturen sowie die Verbreiterung der kanalikulären Membranen in unmittelbarer Nähe von periportalen Hepatozyten lässt eine posttranskriptionelle Regulation durch Endozytose vermuten. Die mRNA-Expression von Bsep war unverändert.

Die Herabregulation von Bsep wurde nach Gabe von Lipopolysaccharid (Mühlfeld et al. 2003) und nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Geier et al. 2005) beschrieben. Da diese proinflammatorischen Zytokine auch bei obstruktiver Cholestase freigesetzt werden (Haga et al. 1989, Beierle et al. 1996) erschien ein Einfluss auf die Expression von Bsep prinzipiell möglich. Es wurden deshalb Zytokin-Hemmversuche mit Hilfe des TNF- $\alpha$ -Fusionsproteins Etanercept und IL-1 $\beta$ -Antagonisten Anakinra bei Ratten mit obstruktiver Cholestase durchgeführt. Das kanalikuläre Bsep-Membransignal blieb nach Hemmung dieser beiden proinflammatorischen Zytokine weitgehend erhalten. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass die Herabregulation von Bsep nach Applikation von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch eine verminderte Bindung des Heterodimers FXR:RXR an das IR-1 Element des Bsep-Promotors verursacht wird (Geier et al. 2005).

Es ist daher zu vermuten, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auch bei obstruktiver Cholestase in periportalen Hepatozyten zu einer verminderten FXR-Bindung an den Bsep-Promotor führen und so eine zonale Herabregulation bewirken. Die Herabregulation von Bsep im humanen Lebergewebe durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wird hauptsächlich posttranskriptionell reguliert (Elferink et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit fanden sich bei obstruktiver Cholestase in periportalen Hepatozyten subapikal vermehrt Bsep-positive Vesikel. Diese Befunde lassen vermuten, dass die lobuläre Zonierung von Bsep ebenfalls posttranskriptionell reguliert ist. Die zonale Verteilung von Mrp2 bei obstruktiver Cholestase (Paulusma et al. 2000) ist identisch mit der Zonierung von Bsep. Hierdurch entsteht ein periportales Kompartiment, mit minimaler kanalikulärer Transporterexpression, und ein perivenöses Kompartiment mit unverändert hoher Transporterexpression.

### **Zonierte Regulation von Ntcp**

Die obstruktive Cholestase führt in periportalen Hepatozyten zu einer selektiven Herabregulation des an der basolateralen Membran lokalisierten "Natrium-Taurocholat-Cotransporting-Polypeptids" (Ntcp) (Gartung et al. 1996). Bei Ratten mit obstruktiver Cholestase und Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  konnte die Herabregulation des Ntcp nicht aufgehoben werden (Geier et al. 2005). Des Weiteren zeigten FXR-/- Mäuse unter obstruktiver Cholestase eine gleichbleibende Expression von Ntcp (Zollner et al. 2005). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Hemmversuchen mit Anakinra und Etanercept konnte die zonierte Regulation von Ntcp ebenfalls nicht gehemmt werden. Kongruent zu den vorliegenden Studien wird Ntcp bei obstruktiver Cholestase somit nicht durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  reguliert. Die starke Herabregulation von Ntcp in periportalen Hepatozyten könnte durch die hohe Gallensalzkonzentration in Zone 1 erklärt werden. In periportalen Hepatozyten liegt durch die zonale Herabregulation von Bsep ein deutlich reduzierter kanalikulärer Gallensalzexport vor, der möglicherweise zu höheren intrazellulären Gallensalzkonzentrationen in dieser Hepatozyten-Population führt. Die periportale Herabregulation des Gallensalztransporters Ntcp muss

somit als ein wichtiger Schutzmechanismus zur Reduktion der basolateralen Gallensalzaufnahme bei hohem Gallensalzangebot und reduziertem kanalikulären Export angesehen werden.

Es ist zu vermuten, dass durch die selektive Herabregulation von Bsep die Aktivierung des Kernrezeptors FXR in den periportalen Hepatozyten verstärkt ist. Für Immunfloreszenzen von FXR und dem Transkriptionsfaktor SHP waren keine geeigneten Antikörper erhältlich.

Neben der transkriptionellen Regulation legen die Ntcp-positiven Vesikel in periportalen Hepatozyten auch eine posttranskriptionelle Regulation durch Endozytose nahe.

### **Bedeutung der zonierten Regulation von Oatp1a4 und Oatp1b2 nach obstruktiver Cholestase**

In der normalen Rattenleber ist die Expression von Oatp1a4 heterogen verteilt. Dabei liegt eine niedrige Expression des Transportproteins periportal und in unmittelbarer Nähe der Zentralvene, d.h. in Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten vor. Stedman et al. beschrieben eine vermehrte Expression der *Oatp1a4 mRNA* bei Mäusen nach Gallengangsligatur (Stedman et al. 2005, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es unter Gallengangsligatur in den Hepatozyten, die physiologischerweise nur eine niedrige Expression des Oatp1a4 aufweisen, zu einer Induktion dieses Transporters kommt. Nach 7d Cholestase lag eine homogene Verteilung über den gesamten Leber-Lobulus vor. Die lobuläre Induktion kam erst durch die Analyse der zonalen Verteilung zur Darstellung und war in Western Blot und Real Time-PCR nicht erkennbar.

Die Expression von Oatp1a4 wird durch den nukleären Rezeptor PXR (Pregnane X Receptor) reguliert (Xie et al. 2001). In Ratten, die mit einem PXR-Agonisten wie z.B. Phenobarbital oder Pregnenolon-16- $\alpha$ -Carbonitril behandelt wurden, wurde Oatp1a4 induziert (Rausch-Derra et al. 2001, Hagenbuch et al. 2001, Guo et al. 2002). Weiterhin kommt es sowohl durch Akkumulation der Gallensäure Lithocholsäure unter cholestatischen Bedingungen (Staudinger et al. 2001), als auch durch Fütterung von Cholsäure zu einer Aktivierung von

PXR und zu einer Induktion von Oatp1a4 (Rost et al. 2003). Die Induktion von *OATP1a4* mRNA blieb in cholestatischen PXR<sup>-/-</sup> Mäusen aus (Staudinger et al. 2003). Die zonale Induktion von Oatp1a4 in der vorliegenden Arbeit ist somit am ehesten durch eine gallensalzvermittelte Aktivierung von PXR bedingt. Die Induktion des Oatp1a4 wurde durch die Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nicht beeinflusst. Vermutlich hebt die PXR-vermittelte Aktivierung des Oatp1a4-Promotors durch Gallensalze bei obstruktiver Cholestase die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf.

Die periportale Expression von Oatp1b2 wird in der cholestatischen Rattenleber ebenfalls induziert. Auch diese Isoform ist in der normalen Rattenleber heterogen verteilt. In periportalen Hepatozyten liegt eine schwächere Expression vor als in den Hepatozyten der Zone 2 und 3. Die Induktion in der cholestatischen Rattenleber erfolgte analog zu Oatp1a4, so dass nach 7 Tagen obstruktiver Cholestase eine homogene lobuläre Expression vorliegt. Bisher ist nur wenig über die Regulation des Oatp1b2 bekannt. Rost et al. beschrieben in Ratten nach Gabe von Cholsäure eine Herabregulation dieses Transporters (Rost et al. 2003). Eine Induktion von Oatp1b2 durch Gallensalze ist daher unwahrscheinlich. Dagegen zeigten Untersuchungen an Mäusen, dass Agonisten der nukleären Rezeptoren CAR und PXR eine Induktion des Oatp1a4 bewirken (Guo et al. 2003). Es ist zu vermuten, dass die Induktion von Oatp1b2 über einen dieser beiden Kernrezeptoren vermittelt wird (Wagner et al. 2005a). Dieser Mechanismus ist vermutlich dafür verantwortlich, dass die nach LPS-Gabe auftretende, zytokinvermittelte Herabregulation von Oatp1b2 bei obstruktiver Cholestase nicht stattfindet. Die durchgeführten Hemmversuche mit Etanercept und Anakinra konnten die Induktion nicht aufheben. Bilirubin stellt einen Liganden und Aktivator für CAR dar und kommt als Kandidat für die Induktion von Oatp1b2 bei obstruktiver Cholestase in Frage.

Es gibt zwei mögliche Erklärungen für die Bedeutung einer zonalen Induktion von Oatp1a4 und Oatp1b2 bei obstruktiver Cholestase.

Zunächst wäre es denkbar, dass sich die Transportrichtung dieser zwei Oatp-Isoformen unter cholestatischen Bedingungen ändert. *In-vitro* Experimente an *Xenopus* Oozyten zeigten, dass Oatp1a4 einen bidirektionalen Transport ermöglicht und unter bestimmten Bedingungen Substanzen aus der Zelle exportiert (Li et al. 2000). Der Export gallepflichtiger Substanzen über die basolaterale Membran stellt einen Kompensationsmechanismus bei Cholestase dar (Kullak-Ublick 1999, Li et al. 2000, Hagenbuch et al. 2001). Oatp1a4 und Oatp1b2 könnten somit neben Mrp3, Mrp4 und Ost $\alpha/\beta$  als weitere Transportsysteme für den basolateralen Export von cholephilen Substanzen fungieren.

Eine zweite mögliche Erklärung basiert auf dem Gedanken, dass cholephile Substanzen bei Cholestase über die basolaterale Hepatozytenmembran zirkulieren könnten. Durch die mehrfache intrazelluläre Passage könnten diese Substanzen besser einer Hydroxylierung und Konjugation zugeführt werden. Basolateral ausgeschiedene Substrate wie polyhydroxylierte Gallensäuren können durch ihre größere Hydrophilie besser kompensatorisch renal ausgeschieden werden.

### **Zonale Verteilung von Entzündungsmediatoren**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die periportale Herabregulation von Bsep bei obstruktiver Cholestase durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erfolgt. Daraus resultierte die Fragestellung, ob die inflammatorische Antwort bei obstruktiver Cholestase zu dieser Zonierung führt.

Die zonale Herabregulation von Bsep durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ließ vermuten, dass die Entzündungsantwort der Leber ebenfalls zoniert erfolgt. Deshalb wurden die Verteilung der leberspezifischen Makrophagen (Kupfferzellen) und der MPO-positiven Entzündungszellen (v.a. neutrophile Granulozyten) untersucht. MPO-positive Zellen waren bei obstruktiver Cholestase periportal deutlich vermehrt.

Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass das Fehlen von Gallensalzen im Intestinum zu einer intestinalen bakteriellen Translokation führt. Dies geht einher mit einer portalen Endotoxämie und bewirkt eine Aktivierung von Kupfferzellen (Sheen-Chen et al. 1998, Minter et al. 2005, Holub et al. 2009). Möglicherweise trägt auch eine höhere periportale Gallensalzkonzentration bei obstruktiver Cholestase zu einer Aktivierung von Kupfferzellen und Granulozyten bei.

Diese in Zone 1 ausgeprägte Entzündungsantwort kann eine zonale Regulation von hepatobiliären Transportern bedingen. Kongruent dazu kam es zu einer vermehrten periportalen Expression von IL-1 $\beta$ .

### **Zonale Verteilung von hepatobiliären Transportern nach**

#### **Lipopolysaccharid-Gabe**

In verschiedenen Vorarbeiten wurde die LPS-abhängige Herabregulation von Bsep (Mühlfeld et al. 2003), Ntcp (Cherrington et al. 2004) und verschiedenen Oatp-Isoformen (Cherrington et al. 2004, Davis et al. 2002) beschrieben. Im Gegensatz zu den Veränderungen bei obstruktiver Cholestase, zeigten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transporter nach Gabe des Endotoxins Lipopolysaccharid keine relevante Zonierung. Dies lässt vermuten, dass die Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach LPS-Gabe nicht, wie bei obstruktiver Cholestase zoniert, sondern panazinär erfolgt. Nach LPS-Gabe nahm die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im gesamten Azinus homogen zu. Die panazinäre proinflammatorische Reaktion nach LPS-Gabe war kongruent zu dem zonalen Verteilungsmuster der untersuchten Transporter.



**Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit**

Gallensalz- und organische Anionentransporter unterliegen bei obstruktiver Cholestase einer zonalen Regulation. Bsep wird bei obstruktiver Cholestase TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ -abhängig reguliert. Es entstehen zwei Kompartimente, von denen das periportale eine cholestatische, das perizentrale Kompartiment jedoch eine praktisch normale Transporterexpression aufweist. Die zonale Herabregulation des Bsep dient dazu, die biliäre Gallensalzsekretion zu reduzieren und somit die cholangiozytäre Schädigung bei obstruktiver Cholestase zu vermindern.

Die zonalen Veränderungen von Ntcp und Oatp1a4 könnten durch eine hohe periportale Gallensalzkonzentration ausgelöst werden. Hierdurch entwickeln periportale Hepatozyten einen "cholestatischen Phänotyp" der Transporterexpression, während sich die Expression in perizentralen Hepatozyten nicht signifikant verändert.

Die Induktion von Oatp1a4 und Oatp1b2 könnte die basolaterale alternative Sekretion von intrazellulären zytotoxischen cholephilen Substraten erleichtern. Das Zusammenspiel dieser Anpassungsvorgänge könnte die Schädigung periportalener Hepatozyten bei Cholestase reduzieren.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen weiterhin, dass das zonale Expressionsmuster der hepatobiliären Transportersysteme bei zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden sollte, da die Transporterregulation in verschiedenen Hepatozytenpopulationen heterogen verlaufen kann und im Western Blot dann möglicherweise unterschätzt wird.

## 6 Zusammenfassung

Die inverse Regulation des Multidrug Resistance Protein 2 (Mrp2) und 3 (Mrp3) stellt einen wichtigen Mechanismus zur Reduktion des cholestatischen Leberschadens dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die zonale Expression der Gallensalztransportpumpe (Bsep), des "Natrium-Taurocholat-Cotransporting-Polypeptid" (Ntcp) und 3 Isoformen der Familie organischer Anionentransporter (Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2) bei obstruktiver Cholestase und nach LPS-Gabe in der Rattenleber untersucht. In der normalen Rattenleber waren Bsep, Ntcp und Oatp1a1 zonal homogen verteilt. Die Expression von Oatp1a4 und Oatp1b2 waren in Hepatozyten der Zone 3 stark exprimiert. Die Expression nahm zur Zone 1 hin kontinuierlich ab. Glutaminsynthetase-positive Hepatozyten wiesen eine deutlich geringere Expression von Oatp1a4 auf als die umliegenden Hepatozyten der Zone 3. Bei obstruktiver Cholestase kam es zu einer signifikanten Herabregulation von Bsep und Ntcp in periportalen Hepatozyten, während die Expression in perivenösen Hepatozyten unverändert blieb. Periportale Hepatozyten zeigten zunehmend Bsep- und Ntcp-positive intrazelluläre Vesikel. Oatp1a4 wurde in Glutaminsynthetase-positiven perizentralen und in periportalen Hepatozyten induziert. Oatp1b2 wurde ebenfalls in periportalen Hepatozyten induziert. Nach Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  war die periportale Herabregulation von Bsep reversibel. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Expression von IL-1 $\beta$  war periportal deutlich stärker ausgeprägt als perizentral. Die übrigen untersuchten Transporter wurden in ihrer Expression und Zonierung nach Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nicht beeinflusst. Nach Gabe von LPS trat keine signifikante Zonierung der untersuchten Transporter auf. Die zonale Herabregulation von Bsep bei obstruktiver Cholestase wird somit durch eine portale Entzündung ausgelöst und durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermittelt. Die periportale Induktion von Oatp1a4 und Oatp1b2, sowie die periportale Herabregulation von Ntcp könnten eine Rolle bei dem vermehrten basolateralen Export und der verminderten Aufnahme von cholephilen Substanzen in Hepatozyten mit deutlicher Herabregulation von Bsep und Mrp2 spielen.

## 7 Summary

Inverse acinar regulation of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) and 3 (Mrp3) represents an important adaptive response to reduce hepatocellular cholestatic injury. This study investigated zonal expression of bile salt export pump (Bsep), sodium cotransporting polypeptid (Ntcp), organic anion transporting polypeptid 1a1 (Oatp1a1), organic anion transporting polypeptid 1a4 (Oatp1a4) and organic anion transporting polypeptid 1b2 (Oatp1b2) in rat liver following bile duct ligation (BDL) and LPS treatment.

In normal rat liver Bsep, Ntcp, Oatp1a1 were homogeneously zoned, whereas Oatp1a4 and Oatp1b2 expression gradually decreased from zone 3 to 1. Glutamine synthetase-positive pericentral hepatocytes had a marker lower Oatp1a4 peak immunofluorescence than the remaining zone 3 hepatocytes. In cholestatic rat liver Bsep and Ntcp peak immunofluorescence in periportal hepatocytes significantly decreased, whereas peak immunofluorescence in pericentral hepatocytes was not significantly altered. Periportal hepatocytes further showed a fuzzy Bsep and Ntcp membrane staining and increasing Bsep- and Ntcp-positive vesicles. Oatp1a4 was induced in periportal hepatocytes and in glutamine synthetase-positive pericentral hepatocytes. Likewise Oatp1b2 was induced in periportal hepatocytes. Inactivation of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  largely inhibited periportal down-regulation of Bsep. Recruiting of neutrophilic granulocytes and expression of IL-1 $\beta$  were more pronounced in periportal hepatocytes regulation and zonation. The other investigated transporters were not influenced by inactivation of TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . No significant transporter zonation was seen following LPS treatment. Zonal down-regulation of Bsep in obstructive cholestasis thus is triggered by portal inflammation and mediated by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

Induction of periportal Oatp1a4 and Oatp1b2 as well as periportal down-regulation of Ntcp may play a role in compensatory basolateral export and decreased uptake of cholephilic substances in hepatocytes with profound down-regulation of Bsep and Mrp2. The mechanism described could contribute to reduce liver injury in obstructive cholestasis.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ananthanarayanan, M., Ng, O.C., Boyer, J.L., and Suchy, F.J.** (1994). Characterization of cloned rat liver Na<sup>+</sup>-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **267**, 637-643.
- Angeletti, R.H., Novikoff, P.M., Juuvadi, S.R., Fritschy, J.M., Meier, P.J., and Wolkoff, A.W.** (1997). The choroid plexus epithelium is the site of the organic transport protein in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 283-286.
- Anwer, M.S. and Hegner, D.** (1978). Effect of Na<sup>+</sup> on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes: evidence for a heterogeneous system. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **359**, 181-192.
- Anwer, M.S.** (2004). Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *Hepatology* **39**(3), 581-590.
- Baier, P.K., Hempel, S., Waldvogel, B., and Baumgartner, U.** (2006). Zonation of hepatic bile salt transporters. *Dig Dis Sci* **51**, 587-593.
- Beierle, E.A., Vauthey, J.N., Moldawer, L.L., and Copeland, E.M.** (1996). Hepatic tumor necrosis factor-alpha production and distant organ dysfunction in a murine model of obstructive jaundice. *Am J Surg* **171**, 202-206.

- Bergwerk, A.J., Sui, X., Ford, A.C., Kanai, N., Jacquemin, E., Burk, R.D., Bai, S., Novikoff, P.M., Stieger, B., Meier, P.J., Schuster, V.L., and Wolkoff, A.W.** (1996). Immunologic distribution of an organic anion transport protein in rat liver and kidney. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **271**, 231-238.
- Boyer, J.L., Trauner, M., Mennone, A., Soroka, C.J., Cai, S.Y., Moustafa, T., Zollner, G., Lee, J.Y., and Ballatori, N.** (2006). Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, 1124-1130.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Cattori, V., van Montfoort, J.E., Stieger, B., Landmann, L., Meijer, D.K.F., Winterhalter, K.H., Meier, P.J., and Hagenbuch, B.** (2001). Localisation of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Eur J Physiol* **443**, 188-195.
- Chen, C. and Klaassen, C.D.** (2004). Rat multidrug resistance protein 4 (Mrp4, Abcc4): Molecular cloning, organ distribution, postnatal renal expression, and chemical inducibility. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 46-53.
- Cherrington, N.J., Slitt, A.L., Li, N. and Klaassen, C.D.** (2004). Lipopolysaccharide-mediated regulation of hepatic transporter mRNA levels in rats. *Drug Metab Dispos.* **32**, 734-741.

- Dahme, E. und Weiss, E.** (2007). Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Davis, R.A., Miyake J.H., Hui T.Y., and Spann N.J.** (2002). Regulation of cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase: barely missing a SHP. *J Lipid Res* **43**, 533–543.
- Dawson, P.A., Hubbert, M., Haywood, J., Craddock, A.L., Zerangue, N., Christian, W.V., and Ballatori, N.** (2005). The heteromeric organic solute transporter  $\alpha$ - $\beta$ , Ost $\alpha$ -Ost $\beta$ , is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* **280**, 6960-6968.
- Denk, G.U., Soroka, C.J., Takemaya, Y., Chen, W.S., Schuetz J.D. and Boyer, J.L.** (2004). Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol.***40**, 585-591.
- Dombrowski, F., Kubitz, R., Chittattu, A., Wettstein, M., Saha, N., and Häussinger, D.** (2000). Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J* **348**, 183-188.
- Donner, M.G. and Keppler, D.** (2001). Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* **34**, 351-359.
- Donner, M.G., Warskulat, U., Saha, N., and Häussinger, D.** (2004). Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS. *Biol Chem* **385**, 331-339.

- Ekberg, K., Chandramouli, V., Kumaran, K., Schumann, W.C., Wahren, J., and Landan, B.R.** (1995). Gluconeogenesis and glucuronidation in liver in vivo and the heterogeneity of hepatocyte function. *Biol Chem* **270**, 21715-21717.
- el Mouelhi, M. and Kauffmann, F.C.** (1986). Sublobular distribution of transferases and hydrolases associated with glucuronide, sulfate and glutathione conjugation in human liver. *Hepatology* **6**, 450-6.
- Elferink, M.G., Olinga, P., Draaisma, A.L., Merema, M.T., Faber, K.N., Slooff, M.J., Meijer, D.K., and Groothuis, G.M.** (2004). LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to posttranscriptional process. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, 1008-1016.
- Gaasbeek-Janzen, J.W., Lamers, W.H., Moormann, A.F., de Graaf, A., Los, J.A., and Charles, R.** (1984). Immunohistochemical localization of carbamoyl-phosphate synthetase (ammonia) in adult rat liver; evidence for a heterogeneous distribution. *J Histochem Cytochem* **32**, 557-564.
- Gao, B., Stieger, B., Noé, B., Fritschy, J.M., and Meier, P.J.** (1999). Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem* **47**, 1255-1264.
- Gartung, C., Ananthanarayanan, M., Rahman, M.A., Schuele, S., Nundy, S., Soroka, C., Stolz, A., Suchy, F.J., and Boyer, J.L.** (1996). Down-regulation of expression and function of the rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **110**, 199-209.

- Gebhardt, R. and Mecke, D.** (1983). Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO J* **2**, 567-570.
- Geier, A., Zollner, G., Dietrich, C.G., Wagner, M., Fickert, P., Denk, H., Van Rooijen, N., Matern, S., Gartung, C., and Trauner, M.** (2005). Cytokine-independent repression of Rodent Ntcp in obstructive cholestasis. *Hepatology* **41**, 470-477.
- Geier, A., Wagner, M., Dietrich, C.G., and Trauner, M.** (2007). Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochem Biophys Acta* **1773**, 283-308.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., and Meier, P.J.** (1998). The sister P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* **273**, 10046-10050.
- Geyer, J., Wilke, T., and Petzinger, E.** (2006). The solute carrier family SLC10: More than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **372**, 413-431.
- Guo, G.L., Staudinger, J.L., Ogura, K., and Klaassen, C.D.** (2002). Induction of rat organic anion transporting polypeptide 2 by pregnenolone-16alpha-carbonitrile is via interaction with pregnane X receptor. *Mol Pharmacol* **61**, 832-839.



- Guo, G.L., Lambert, G., Negishi, M., Ward, J.M., Brewer, H.B. Jr., Kliewer, S.A., Gonzalez, F.J., and Sinal, C.J.** (2003). Complementary roles of farnesoid-X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J Biol Chem* **278**, 45062-45071.
- Haga, Y., Sakamoto, K., Egami, H., Yokoyama, Y., Arai, M., Mori, K., and Akagi, M.** (1989). Changes in production of interleukin-1 and interleukin-2 associated with obstructive jaundice and biliary drainage in patients with gastrointestinal cancer. *Surgery* **106**, 842-848.
- Häussinger, D.** (1983). Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur J Biochem* **133**, 269-275.
- Häussinger, D., Sies, H., and Gerok, W.** (1985). Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle. *J Hepatol.* **1**, 3-14.
- Häussinger, D.** (1985). Hepatic ammonium detoxification. *Fortschr Med.* **103**, 1049-1051.
- Häussinger, D.** (1986). Regulation of hepatic ammonia metabolism: The intercellular glutamine cycle. *Adv Enzyme Regul.* **25**, 159-180.
- Häussinger, D., Lamers, D.H., and Moormann, A.F.** (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* **46**, 72-93.
- Häussinger, D.** (1998). Hepatic glutamine transport and metabolism. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **72**, 43-86.

- Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lubbert, H., and Meier, P.J.** (1991). Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10629-10633.
- Hagenbuch, B. and Meier, P.J.** (1996). Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis* **16**, 129-136.
- Hagenbuch, B., Reichel, C., Stieger, B., Cattori, V., Fattinger, K.E., Landmann, L., Meier, P.J., and Kullak-Ublick, G.A.** (2001). Effect of phenobarbital on the expression of bile salt and organic anion transporters of rat liver. *J Hepatol* **34**, 881-887.
- Hagenbuch, B. and Dawson, P.** (2004). The sodium bile salt cotransport family SLC 10. *Pflugers Arch* **447**, 566-570.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., and Sugiyama, Y.,** (1999). Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem.* **274**, 15181-15185.
- Holub, M., Cheng, C.W., Mott, S., Wintermeyer, P., von Rooijen, N. and Gregory, S.H.** (2009). Neutrophils sequestered in the liver suppress the proinflammatory response of Kupffer cells to systemic bacterial infection. *J Immunol.* **183**, 3309-3316.
- Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J.** (1994). Expression cloning of a rat liver Na<sup>+</sup>-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 133-137.
- Jungermann, K.** (1995). Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* **103**, 81-91.

- Kakyo, M., Sakagami, H., Nishio, D., Nakagomi, R., Tokui, T., Naitoh, T., Matsuno, S., Abe, T., and Yao, H.** (1999a). Immunohistochemical distribution and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide2 (Oatp2). *FEBS Lett* **445**, 343-346.
- Kakyo, M., Unno, M., Tokui, T., Nakagomi, R., Nishio, T., Iwasashi, H., Nakai, D., Seki, M., Suzuki, M., Naitoh, T., Matsuno, S., Yawo, H., and Abe, T.** (1999b). Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rlst-1. *Gastroenterology* **117**, 770-775.
- Kietzmann, T. and Jungermann, K.** (1997). Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int* **51**, 402-412.
- Kipp, H. and Arias, I.M.** (2002). Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol* **64**, 595-608.
- Klinke, R. und Silbernagl, S.** (2005) Lehrbuch der Physiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kubitz, R., D'Urso, D., Keppler, D. and Häussinger, D.** (1997). Osmodependant dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* **113**, 1438-1442.
- Kubitz, R., Wettstein, M., Warskulat, U., and Häussinger, D.** (1999). Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* **116**, 401-410.

- Kullak-Ublick, G.A.** (1999). Regulation of organic anion and drug transporters of the sinusoidal membrane. *J Hepatol* **31**, 563-573.
- Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., Hagenbuch, B., and Meier, P.J.** (2000). Hepatic transport of bile salts. *Sem in Liver Dis* **20**, 273-292.
- Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., and Meier, P.J.** (2000). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**, 322-342.
- Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., and Meier, P.J.** (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**, 322-342.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, J.M., Trauner, M., Soroka, C.J., Stieger, B., Meier, P.J., and Boyer, J.L.** (2000). Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **118**, 163-172.
- Lee, J., Azzaroli, F., Wang, L., Soroka, C.J., Gigliozzi, A., Setchell, K.D., Kramer, W., and Boyer, J.L.** (2001). Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **121**, 1473-1484.
- Li, L., Lee, T.K., Meier, P.J., and Ballatori, N.** (1998). Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C<sub>4</sub> as a substrate for Oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* **273**, 16184-16191.

- Li, L., Meier, P.J., and Ballatori, N.** (2000). Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* **58**, 335-340.
- Meier, P.J.** (1995). Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **269**, 801-812.
- Meier, P.J., Eckhardt, U., Schroeder, A., Hagenbuch, B., and Stieger, B.** (1997). Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* **26**, 1667-1677.
- Meier, P.J. and Stieger, B.** (2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* **64**, 635-661.
- Minter, R.M., Fan, M.H., Sun, J., Niederbichler, A., Ipaktchi, K., Arbabi, S., Hemmilo, M.R., Remick, D.G., Wang, S.C. and Su, G.L.** (2005). Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery* **138**, 230-245.
- Mühlfeld, A., Kubitz, R., Dransfeld, O., Häussinger, D. and Wettstein, M.** (2003). Taurine supplementation induces multidrug resistance protein 2 and bile salt export pump expression in rats and prevents endotoxin-induced cholestasis. *Arch Biochem Biophys* **413**, 32-40.
- Müller, M. and Jansen, P.L.M.** (1998). The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. *J Hepatol* **28**, 344-354.
- Nathanson, M.H. and Boyer, J.L.** (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* **14**, 551-566.

- Noe, B., Hagenbuch, B., Stieger, B., and Meier, P.J.** (1997). Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10346-10350.
- Pang, K.S., Schwab, A.J., Goresky, C.A., and Chiba, M.** (1994). Transport, binding, and metabolism of sulphate conjugates in the liver. *Chem Biol Interact* **92**, 179-207.
- Paulusma, C.C., Kothe, M.J.C., Bakker, C.T.M., Bosma, P., van Bokhoven, I., van Marle, J., Bolder, U., Tytgat, G.N., and Oude Elferink, R.P.** (2000). Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* **31**, 684-693.
- Petzinger, E.** (1994). Transport of organic anions in the liver. An update on bile acid, fatty acid, monocarboxylate, anionic amino acid, cholephilic organic anion, and anionic drug transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **123**, 47-211.
- Petzinger, E. and Geyer, J.** (2006). Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **372**, 465-475.
- Rausch-Derra, L.C., Hartley, D.P., Meier, P.J., and Klaassen, C.D.** (2001). Differential effects of microsomal enzyme-inducing chemicals on the hepatic expression of rat organic anion transporters, Oatp1 and Oatp2. *Hepatology* **33**, 1469-1478.
- Reichel, C., Gao, B., van Montfoort, J., Cattori, V., Rahner, C., Hagenbuch, B., Stieger, B., Kamisako, T., and Meier, P.J.** (1999). Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* **117**, 688-695.

- Rost, D., Herrmann, T., Sauer, P., Schmidts, H.L., Stieger, B., Meier, P.J., Stremmel, W., and Stiehl, A.** (2003). Regulation of rat organic anion transporters in bile salt-induced cholestatic hepatitis: Effect of ursodeoxycholate. *Hepatology* **38**, 187-195.
- Schmitt, M., Kubitz, R., Wettstein, M., vom Dahl, S., and Häussinger, D.** (2000). Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol Chem* **381**, 487-495.
- Sheen-Chen, S.M., Chau, P., and Harris, H.W.** (1998). Obstructive jaundice alters Kupffer cell function independent of bacterial translocation. *J Surg Res.* **80**, 205-209.
- Singer, I.I., Kaka, D.W., Kazazis, D.M., Alberts, A.W., Chen, J.S., Huff, J.W., and Ness, G.C.** (1984). Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase-containing hepatocytes are distributed periportally in normal and mevinolone treated rat livers. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 5556-55560.
- Soroka, C.J., Lee, J.M., Azzaroli, F., and Boyer, J.L.** (2001). Cellular localisation and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* **33**, 783-791.
- Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaToer, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., Willson, T.M., Koller, B.H., and Kliewer, S.A.** (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3369-3374.

- Staudinger, J.L., Madan, A., Carol, K.M. and Parkinson, A.** (2003). Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos* **31**, 523-527.
- Stedman, C.A., Liddle, C., Coulter, S.A., Sonoda, J., Alvarez, J.G., Moore, D.D., Evans, R.M., and Downes, M.** (2005). Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2063-2068.
- Stedman, C.A., Liddle, C., Coulter, S.A., Sonoda, J., Alvarez, J.G., Evans, R.M., Downes, M.** (2006). Benefit of farnesoid-X receptor inhibition in obstructive cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 11323-11328.
- Stieger, B., Hagenbuch, B., Landmann, L., Hochli, M., Schroeder, A., and Meier, P.J.** (1994). In situ localisation of the hepatocytic Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* **107**, 1781-1787.
- Stieger, B. and Meier, P.J.** (2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* **64**, 635-661.
- Twisk, J., Hoekman, M.F., Mager, W.H., Moormann, R.F., de Boer, P.A., Scheja, L., Princen, H.M., and Gebhardt, R.** (1995). Heterogeneous expression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase genes in the rat liver lobulus. *J Clin Invest* **95**, 1235-1243.
- Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C.J., Ananthanarayanan, M., Koeppl, T.A., Schlosser, S.F., Suchy, F.J., Keppler, D., and Boyer, J.L.** (1997). The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* **113**, 255-264.



- Trauner, M., Meier, P.J., and Boyer, J.L.** (1998). Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* **339**, 1217-1227.
- Trauner, M., Meier, P.J., and Boyer, J.L.** (1999). Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol* **31**, 165-178.
- Trauner, M. and Boyer, J.L.** (2002). Cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol* **18**, 314-329.
- Trauner, M. and Boyer, J.L.** (2003) Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* **83**, 633-671.
- Vos, T.A., Hooiveld, G.J.E.J., Koning, H., Childs, S., Meijer, D.K.F., Moshage, H., Jansen, P.L.M., and Müller, M.** (1998). Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* **28**, 1637-1644.
- Wagner, M., Halilbasic, E., Marschall, H.U., Zollner, G., Fickert, P., Langner, C., Zatloukal, K., Denk, H., and Trauner, M.** (2005a). CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology* **42**, 420-430.
- Wagner, M. and Trauner, M.** (2005b). Transcriptional regulation of hepatobiliary transport systems in health and disease: implications for a rationale approach to the treatment of intrahepatic cholestasis. *Ann Hepatol* **4**, 77-99.
- Weinmann, S.A.** (1997). Electrogenicity of Na<sup>+</sup>-coupled bile acid transporters. *Yale J Biol* **70**, 331-340.

- 
- Xie, W., Radominska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C.M., Nelson, M.C., Ong, E.S., Waxman, D.J., and Evans, R.M.** (2001). An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3375-3380.
- Zollner, G., Fickert, P., Fuchsbichler, A., Silbert, D., Wagner, M., Arbeiter, S., Gonzalez, F.J., Marschall, H.U., Zatloukal, K., Denk, H., and Trauner, M.** (2003). Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidneys and intestine. *J Hepatol* **39**, 480-488.
- Zollner, G., Wagner, M., Fickert, P., Geier, A., Fuchsbichler, A., Silbert, D., Gumhold, J., Zatloukal, K., Kasar, A., Tilg, H., Denk, H., and Trauner, M.** (2005). Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, 798-805.

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Markus Donner für die Betreuung der praktischen und vor allem der theoretischen Arbeit, die kritische Durchsicht der vorliegenden Dissertation sowie die fachlich aufschlussreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger danke ich für die die Bereitstellung des klinisch und wissenschaftlich höchstinteressanten und vielversprechenden Themas, die Aufnahme in den Arbeitskreis seiner Klinik und die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten und für die gründliche Durchsicht dieser Dissertation.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Verena Keitel für die Einarbeitung und Unterstützung am Konfokalen Laserscanningmikroskop, sowie die stete Bereitschaft der kollegialen Unterstützung und Herrn Dr. Boris Görg für die Bereitstellung der mit Lipopolysaccharid behandelten Organpräparate. Herrn PD Dr. Ulrich Warskulat danke ich für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Durchführung der RT-PCR.

Mein Dank geht an Daniela Stapelkamp für die Einführung in die experimentellen Arbeitsmethoden und ihre Hilfsbereitschaft. Bei Katrin Haselow und Verena Fuchs möchte ich mich bedanken, dass sie das Arbeiten so angenehm und humorvoll gestaltet und mich in vielen Fragen mit Rat und Tat unterstützt haben.

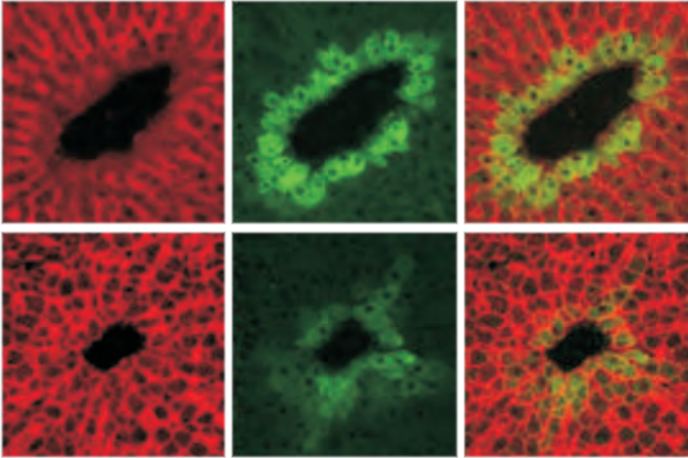
Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für Ihre Geduld und Rücksichtnahme, meiner Schwester Sabine für Ihre sowohl fachliche als auch persönliche Hilfe, Antonia und Moritz - ohne die diese Dissertation nie angefertigt worden wäre.

## ERKLÄRUNG

"Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in den "Satzungen der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Stephanie Schumacher



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5727-5



9 783835 957275