

Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der
hepatozellulären Cholestase und zur Induktion der
Hämoxygenase-1 als therapeutische Strategie bei
experimenteller kalter Ischämie und Reperfusion
der Rattenleber

Anna Krien

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.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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 2014

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.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

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 Donner

**Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der
hepatozellulären Cholestase und zur Induktion der
Hämoxygenase-1 als therapeutische Strategie bei
experimenteller kalter Ischämie und Reperfusion der
Rattenleber**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Anna Krienen

Tierärztin aus Mönchengladbach

Gießen 2014

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

Dekan:

Prof. Dr. M. Kramer

Gutacher:

Prof. Dr. E. Petzinger

Dr. M. Donner

Tag der Disputation:

13.02.2014

Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht

M.G. Donner, S.A. Topp, A. Krien, P. Cebula, A. Macher, T. Gehrman, B.H. Pannen, W.T. Knoefel, D. Häussinger (2011).

Pericentral downregulation of Bsep and Mrp2 following experimental ischemia and reperfusion is restored by HbG 200-mediated preinduction of heme oxygenase-1. *Journal of Hepatology* **54**, S23-S24.

Donner M.G., Topp S.A., Cebula P., Krien A., Gehrman T., Sommerfeld A., Reinehr R., Macher A., Herebian D., Mayatepek E., Pannen B.H., Knoefel W.T., Häussinger D. (2012).

HbG200-mediated preinduction of heme oxygenase-1 improves bile flow and ameliorates pericentral downregulation of Bsep and Mrp2 following experimental liver ischemia and reperfusion. *Biological Chemistry* **394**, 97-112.

I Inhaltsverzeichnis

I INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Aufbau der Leber, makroskopische Anatomie.....	1
1.2 Mikroskopische Anatomie.....	3
1.3 Funktionelle Einheit des Leberlobulus	5
1.3.1 Der klassische Leberlobulus	5
1.3.2 Der Azinus nach RAPPAPORT	6
1.4 Physiologie der Leber.....	8
1.5 Hepatozellulärer Transport von Gallensalzen und organischen Anionen	10
1.5.1 Basolaterale Aufnahme von Gallensalzen und organischen Anionen.....	11
1.5.1.1 Natrium-abhängige Aufnahme von Gallensalzen “Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide“	11
1.5.1.2 Natrium-unabhängige Aufnahme von Gallensalzen und organischen Anionen “Organic-Anion-Transporting-Polypeptides“ (Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2)	12
1.5.2 Kanalikuläre Sekretion von Gallensalzen und organischen Anionen	13
1.5.2.1 “Bile salt export pump“ (Bsep).....	14
1.5.2.2 Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (Mrp2).....	15
1.6 Hämoxygenase-1 (HO-1).....	17
1.7 Transporterregulation bei Cholestase	18
1.7.1 “Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide“ (Ntcp).....	18
1.7.2 “Organic-Anion-Transporting-Polypeptides“ (Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2)	19
1.7.3 “Bile salt export pump“ (Bsep)	19
1.7.4 Multidrug Resistance-Associated Protein (Mrp2)	20

1.8	Lebertransplantation und Cholestase	21
1.8.1	Entwicklung der Organtransplantation.....	21
1.8.1.1	Entwicklung der Lebertransplantation.....	22
1.8.1.2	Hepatischer Konservierungsschaden.....	22
1.8.1.3	Mechanismen der Cholestase nach Ischämie und Reperfusion der Leber.....	24
1.8.1.4	Bedeutung der Konservierungslösungen.....	25
1.8.1.5	Bedeutung von Hämoglobin Glutamer-200 (HbG-200).....	26
1.8.1.6	Bedeutung von SnProtoporphyrin IX ("tin Protoporphyrin", SnPP IX).....	27
1.8.1.7	Bedeutung der Kupffer-Zellen bei der Entstehung einer Cholestase.....	28
1.9	Allgemeine Einführung in die Fragestellung / Zielsetzung der Arbeit	29
2	MATERIALIEN	31
2.1	Geräte	31
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	32
2.3	Lösungen und Puffer	33
2.4	Antikörper	35
2.4.1	Primärantikörper.....	35
2.4.2	Sekundärantikörper.....	37
3	METHODEN	38
3.1	Tierversuche	38
3.1.1	Tierversuchsgenehmigung.....	38
3.1.2	Versuchstiere und Haltung.....	38
3.1.3	Versuchsgruppen.....	39
3.1.4	Präinduktion der Hämoxxygenase-1 mittels Hämoglobin Glutamer-200.....	39
3.1.5	Modell der isoliert perfundierten Rattenleber.....	40
3.1.6	Präkonditionierung von Kontrolltieren mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX	41
3.2	Histologische Methoden	41
3.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanningmikroskopie	41
3.2.1.1	Anfertigung der Kryoschnitte.....	41
3.2.1.2	Immunhistologische Färbung	42
3.2.1.3	Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	42
3.2.1.4	Densitometrische Auswertung	42

3.3	Proteinanalytische Methoden	43
3.3.1	Isolierung der Gesamtmembranfraktion aus Lebergewebe.....	43
3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	44
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.3.4	Immunoblot Analyse (Western Blot)	46
3.3.4.1	Proteintransfer.....	46
3.3.4.2	Das Reaktionsprinzip der Chemolumineszenz	47
3.3.4.3	Densitometrische Auswertung	47
4	ERGEBNISSE	49
4.1	Konfokale Laserscanningmikroskopie	49
4.1.1	Expression von hepatobiliären Transportern bei Kontrolltieren.....	49
4.1.2	Zonierte Regulation von hepatobiliären Transportern nach kalter Ischämie und Reperfusion.....	50
4.1.3	Effekt der Induktion der Hämoxxygenase-1 auf die Lokalisation hepatobiliärer Transporter.....	51
4.1.4	Effekt der pharmakologischen Hemmung der Hämoxxygenase-1 mit SnProtoporphyrin IX auf die Lokalisation hepatobiliärer Transporter.....	52
4.1.5	Induktion der Hämoxxygenase-1 durch Hämoglobin Glutamer-200	72
4.1.6	Pharmakologische Hemmwirkung von SnProtoporphyrin IX auf die Hämoxxygenase-1.....	72
4.1.7	Effekt der Präkonditionierung von Kontrolltieren mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX auf die Lokalisation hepatobiliäre Transporter	75
4.2	Western Blot	82
4.2.1	Proteinexpression von hepatobiliären Transportern bei Kontrolltieren.....	82
4.2.2	Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach kalter Ischämie und Reperfusion.....	82
4.2.3	Effekt der Induktion der Hämoxxygenase-1 auf die Proteinexpression hepatobiliärer Transporter.....	83
4.2.4	Effekt der pharmakologischen Hemmung der Hämoxxygenase-1 mit SnProtoporphyrin IX auf die Proteinexpression hepatobiliärer Transporter.....	83
4.2.5	Induktion der Hämoxxygenase-1 durch Hämoglobin Glutamer-200	86
4.2.6	Pharmakologische Hemmwirkung von SnProtoporphyrin IX auf die Hämoxxygenase-1.....	86
4.2.7	Effekt der Präkonditionierung von Kontrolltieren mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX auf die Proteinexpression hepatobiliärer Transporter	88
5	DISKUSSION	91
5.1	Mechanismen der Endozytose hepatobiliärer Transporter	92

5.2	Regulation von Ntcp	93
5.3	Zonale Verteilung der Induktion der HO-1	93
5.4	Induktion der HO-1 als therapeutische Strategie zur Verbesserung der hepatobiliären Funktion nach kalter Ischämie und Reperfusion	94
5.5	Mögliche Ursachen der fehlenden Regulation von Ntcp nach HO-1 Induktion	96
5.6	Schlussfolgerung	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	SUMMARY	99
8	LITERATURVERZEICHNIS	100
9	DANKSAGUNG	121
10	ERKLÄRUNG	123

II Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Bau des Leberläppchens
- Abb. 2** Schematische Abbildung des klassischen Leberlobulus
- Abb. 3**
- a) Schematische Abbildung des Azinus nach Rappaport
 - b) Dreidimensionale Rekonstruktion von Leberläppchen
- Abb. 4** Lokalisation und Funktion von sinusoidalen und kanalikulären hepatozellulären Transportern in der Rattenleber
- Abb. 5** Lokalisation von Mrp2 und Glutaminsynthetase
- Abb. 6** Quantitative Immunfluoreszenz von Mrp2
- Abb. 7** Lokalisation von Mrp2 und ZO-1
- Abb. 8** Lokalisation von Bsep und Glutaminsynthetase
- Abb. 9** Quantitative Immunfluoreszenz von Bsep
- Abb. 10** Lokalisation von Bsep und ZO-1
- Abb. 11** Lokalisation von Ntcp und Glutaminsynthetase
- Abb. 12** Quantitative Immunfluoreszenz von Ntcp
- Abb. 13** Lokalisation von Oatp1a1 und Glutaminsynthetase
- Abb. 14** Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a1
- Abb. 15** Lokalisation von Oatp1a4 und Glutaminsynthetase
- Abb. 16** Lokalisation von Oatp1a4 im Bereich der Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten
- Abb. 17** Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a4
- Abb. 18** Lokalisation von Oatp1b2 und Glutaminsynthetase
- Abb. 19** Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1b2
- Abb. 20** Zellspezifische Lokalisation und Expression der Hämoxygenase-1 nach Induktion mit Hämoglobin Glutamer-200
- Abb. 21** Immunfluoreszenz von Kontrolltieren nach Präkonditionierung mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX
- Abb. 22** Quantitative Immunfluoreszenz von Kontrolltieren
- Abb. 23** Immunoblot-Analyse von Mrp2, Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2

- Abb.24** Quantitative Proteinexpression von Mrp2, Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2
- Abb.25** Immunoblot-Analyse von HO-1
- Abb.26** Quantitative Proteinexpression von HO-1
- Abb.27** Immunoblot-Analyse von Kontrolltieren nach Präkonditionierung mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX
- Abb.28** Quantitative Proteinexpression von Kontrolltieren nach Präkonditionierung mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX

III Abkürzungen und Symbole

μ	Mikro
°C	Grad Celsius
A., Aa.	Arteria, Arteriae
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B Gen
AP1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Bsep	"Bile salt export pump" (Gallensalzexportpumpe)
ca.	circa
CAR	konstitutiver Androstan Rezeptor ("constitutive androstane receptor")
cDNA	komplementäre DNA ("complementary DNA")
cm	Zentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy2	grün fluoreszierendes Carbocyanin 2, grün fluoreszierender Sekundärantikörper
Cy3	rot fluoreszierendes Carbocyanin 3, rot fluoreszierender Sekundärantikörper
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang ("double strand")
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ECL	verstärkte Chemolumineszenz ("enhanced

	chemiluminescence“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum (“fetal calf serum“)
FXR	Farnesoid X Rezeptor (“farnesoid X activated receptor“)
g	Gravitationskonstante ($9,897 \text{ m/s}^2$)
g, kg, mg, μg , ng, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Gramm, Kilo-, Milli-, Mikro-, Nanogramm, Mikrogramm pro Mikroliter
GS	Glutaminsynthetase
h, min, sek	Stunde, Minute, Sekunde
HbG-200	Hämoglobin Glutamer-200 (Oxyglobin [®])
HAES	Hydroxyethylenstärke, Plasmaexpander
HN-Puffer	Puffer zur Homogenisierung des Lebergewebes
HNF-1 α	Hepatozyten Kernfaktor 1 α (“hepatocyte nuclear factor-1 α “)
HNF-3 β	Hepatozyten Kernfaktor 3 β (“hepatocyte nuclear factor-3 β “)
HNF-4 α	Hepatozyten Kernfaktor 4 α (“hepatocyte nuclear factor-4 α “)
HO-1	Hämoxygenase-1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I	Ischämie
I+HbG-200	Ischämie+Hämoglobin Glutamer-200
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
K	Kontrolle
l, ml, μl	Liter, Milli-, Mikroliter
LPS	Lipopolysaccharid
M, mM, μM , nM, pM	Molar, Milli-, Mikro-, Nano-, Picomolar
mA	Milliampere
MKK7	MAP Kinase / Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase 7

	(“mitogen activated proteinkinase kinase 7”)
mRNA	Boten-RNA (“messenger RNA“)
Mrp2	Multidrug Resistance-Associated Protein 2
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF- κ B	Kernfaktor Kappa-Leichtkette-Erweiterer von aktivierten B-Zellen (“nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells“)
NO	Stickstoffmonoxid
nPKC	neue Proteinkinase C (“novel Proteinkinase C“)
Ntcp	“Na ⁺ /taurocholate-cotransporting-polypeptide“, (Natrium-taurocholat kotransportierendes Polypeptid)
O ₂	Sauerstoff
Oatp1a1	“Organic-Anion-Transporting Polypeptide1a1“, (Organische Anionen transportierendes Polypeptid1a1)
Oatp1a4	“Organic-Anion-Transporting Polypeptide1a4“, (Organische Anionen transportierendes Polypeptid1a4)
Oatp1b2	“Organic-Anion-Transporting Polypeptide1b2“, (Organische Anionen transportierendes Polypeptid1b2)
p< 0,05	statistisch significant
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (“phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (“polymerase chain reaction“)
PI3 Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PP2B	Proteinphosphatase 2B
PXR	Pregnan X-Rezeptor (“pregnane X receptor“)
RAR	Retinsäure-Rezeptor (“retinoic acid receptor“)

RL-Puffer	Puffer zur Lösung des Membranpellet
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ("reactive oxygen species")
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler ("Standard Error of the Mean")
SnPP IX	SnProtoporphyrin IX ("tin-protoporphyrine", Zinn-Protoporphyrin)
Src Kinase	Tyrosinkinase Src
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit 0,05% Tween 20
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
UV	Ultraviolett
UW-Lösung	Belzer-University of Wisconsin Lösung
V., Vv.	Vena, Venae
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen ("volume per volume")
vs.	versus, im Vergleich zu
w/v	Gewicht pro Volumen ("weight per volume")
ZO-1	Zona occludens Protein-1, Tight Junction Protein-1

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Leber, makroskopische Anatomie

In der embryonalen Entwicklung entsteht aus einer ventralen Epithelknospe des hepatopankreatischen Ringes des Duodenums die Leber. Sie ist eines der unpaaren Bauchhöhlenorgane und das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers (Tremblay und Zaret, 2005). Bei fortschreitender Entwicklung wird die kraniale Pars hepatica und die kaudale Pars cystica erkennbar. Die Pars hepatica stellt dabei die eigentliche Leberanlage dar. Aus ihr entstehen zusammen mit dem Gefäßsystem das Leberparenchym und die Cholangiolen. Aus der kleineren Pars cystica entstehen das intra- und extrahepatische Gallengangssystem sowie die Gallenblase (Tremblay und Zaret 2005). Die Leber wird von einer teilweise elastischen Kapsel aus Kollagenfasern (Tunica fibrosa oder Glisson-Kapsel) umgeben. Dieser sind nach außen eine Tunica subserosa und eine Tunica serosa angelagert. Von der bindegewebigen Kapsel aus ziehen lockere Kollagenfaserbündel als interstitielles Gewebe in das Leberparenchym und führen zu- und ableitende Blutgefäße, Gallengänge und Nervenplexus mit sich. Durch die Anordnung dieser Fasern und durch den Verlauf der Gefäße kommt es zu einer Gliederung der Leber in Leberläppchen (Lobus hepaticus / Lobuli hepatici), die beim Schwein durch die besonders stark ausgebildeten interlobulären Septen schon makroskopisch sichtbar sind. Bei den unterschiedlichen Tierarten unterscheidet sich die Gestalt der Leber, insbesondere in ihrer Anzahl und Tiefe der Lappung. Wiederkäuer besitzen das am einfachsten, Fleischfresser und Nagetiere das am stärksten gegliederte Organ. Die Konsistenz der Leber ist elastisch und ihre Farbe je nach Blutgehalt rötlich-braun (Hjortso 1951, Couinand 1957, Gupta, 1977). Die Blutgefäße V. portae, A. hepatica und die Vv. hepaticae sowie das Gallengangssystem prägen im Wesentlichen den Aufbau der Leber. Im intrahepatischen Gefäßsystem wird nährstoffreiches Blut (funktionelles System) aus dem Pfortadersystem mit sauerstoffreichem Blut (nutritives System) aus der A. hepatica vereint. Die V. portae, die ca. 70 % des Blutes zur Versorgung der Leber liefert, tritt am Leberhilus in das Organ ein und ist

das dominierende zuführende Gefäß. Sie zweigt sich im interstitiellen Gewebe zu Vv. interlobulares auf. Gemeinsam liegen beide Gefäßnetze an der Außenkante der Leberläppchen und bilden zusammen mit einem interlobulären Gallengang (Ductus biliferi interlobulares) die Lebertrias (Trias hepatica, GLISSONsche Trias). Im interlobulären Bindegewebe verzweigen sich die A. und V. interlobularis endgültig über Arteriolen und Venolen bis zu kleinsten Kapillaren, die rechtwinkelig in die Leberläppchen eintreten. Unmittelbar nach dem Eintritt vereinigen sich die arteriellen und venösen Gefäßsysteme in Sinuskapillaren (Lebersinusoide, Vasa sinusoida), die arteriovenöses Mischblut führen. Die Sinuskapillaren verlaufen vom äußeren Rand eines jeden Leberläppchens radiär in dessen Zentrum und vereinigen sich dort zur Zentralvene (V. centralis). Die Vv. centrales ihrerseits vereinigen sich zu Vv. hepaticae, die gemeinsam in die V. cava caudalis münden (Grisham et al. 1976, McCuskey 2000). Die Leberläppchen bilden eine strukturelle und funktionelle Einheit, bestehend aus entodermalen Leberzellen und mesodermalen Sinuskapillaren. Durch die unterschiedliche Blutzusammensetzung vom Läppchenrand zur Läppchenmitte werden drei Zonen unterschieden, die fließend ineinander übergehen (Chang et al. 1989):

Zona peripheralis, Zona intermedia, Zona centralis.

Die Einteilung in polygonale Leberläppchen ist eine strukturelle und dadurch rein deskriptiv. Sie sieht die Zentralvene im Zentrum und das lockere Bindegewebe als äußere Begrenzung. Ein einzelnes Leberläppchen weist eine Länge von 1,5-2 mm und eine Breite von 0,8-1,5 mm auf, es stellt eine Ansammlung von Leberzellen dar. Alle Leberläppchen erscheinen bei den Haussäugetieren im histologischen Querschnitt polygonal und eng aneinander liegend (Kiernan 1833, Beresford und Henninger 1986). Die Sinuskapillaren in der Leber weisen eine Reihe an Besonderheiten auf. Sie anastomosieren vielfach miteinander und besitzen unregelmäßige Ausbuchtungen, die das durchströmende Blut wesentlich verlangsamen und dadurch den Stoffaustausch mit der Leberzelle fördern. Es wird immer mindestens eine Oberfläche des Hepatozyten von einem Sinusoid erreicht. Die Sinusoide sind mit flachen Endothelzellen ausgekleidet, zwischen denen Kupffer-Zellen (Macrophagocyti stellati), eine Sonderform der endothelialen

Wandauskleidung, liegen. Sie übernehmen als Bestandteil des MPS-Systems (Mononukleäres–Phagozytose-System) phagozytotische Aufgaben und entfernen zirkulierende Zellfragmente und geschädigte Blutzellen sowie Bakterien oder aber auch gelöste Substanzen aus dem Blut. Sie sind auch aktiv am Abbau des Hämoglobins aus Erythrozyten beteiligt, wodurch Bilirubin entsteht, dass von den Kupffer-Zellen ausgeschieden und an die Hepatozyten weitergegeben wird (Ito 1951, Mak und Lieber 1984, Wisse et al. 1985, Aterman 1986, Wake et al. 1990, Mc Guire et al. 1992, Winwood und Arthur 1993). Zwischen der freien Oberfläche der Hepatozyten und der Außenfläche der Lebersinusoiden befindet sich ein schmaler Spaltraum, der auch als perisinusoidaler Raum (Spatium perisinusoideum) oder als Disse-Raum bezeichnet wird (Motta und Porter 1974).

1.2 Mikroskopische Anatomie

Die Leberzellen ("Hepatocytus"), liegen in Leberzellplatten ("Laminae hepatis") angeordnet, die in ihrer Gesamtheit ein dreidimensionales, schwammartiges System bilden und in dessen Innenräumen das sinusoidale Kapillarnetz eingeschlossen wird. Die Leberzellplatten verlaufen radiär zur Zentralvene. Die einzelne Leberzelle ist 25-30 µm groß, polygonal und schließt einen runden Kern ein. Vielfach besitzen die Leberzellen aber auch zwei Kerne, sind tetraploid oder sogar oktaploid. Untereinander sind die Hepatozyten mit "gap junctions" verbunden. Das Leberzellzytoplasma ist durch die Vielfalt der Zellfunktionen reich an stoffwechselaktiven Organellen, die neben dem Zytosol die Grundvoraussetzung für alle Stoffwechselvorgänge in der Leberzelle bilden (Philips und Satir, 1988, Schachter 1988, Meier 1988, Nathanson und Boyer 1991). Die Leberzellen weisen immer mindestens eine, oftmals aber auch zwei bis drei Zelloberflächen auf, die mit dem Disse-Raum in Verbindung stehen. An diesen Zelloberflächen sind Mikrovilli ausgebildet, die dem Ionenaustausch und der Reabsorption von Stoffen dienen oder als Rezeptoren für Hormone funktionieren. Die Gallesekretion erfolgt gegen den Blutstrom in ein gesondertes Drainagesystem. Durch die Erweiterung des interzellulären Raums wird ein tubuläres Gangsystem ausgespart, die Gallenkanälchen ("Canaliculi biliferi"), die dann die Galleflüssigkeit aufnehmen. Die Gallenkanälchen münden nahe der Leberläppchenoberfläche in kurze kleinere

Gallengänge ("Ductuli biliferi", HERING-Kanälchen), die aus dem Leberläppchen austreten und sich im interstitiellen Bindegewebe zu einem größeren Gallengang ("Ductus interlobularis biliferus") vereinigen. Diese Gallengänge sind Bestandteile der Lebertrias und liegen in den periportal en Feldern. Zum Ausführungsgang ("Ductus hepaticus"), der das Organ an der Leberpforte verlässt, werden mehrere Ductus interlobulares vereinigt (Watanabe und Phillips 1984, Gumucio und Miller 1982, Desmet et al. 1997, Rappaport et al. 1954).

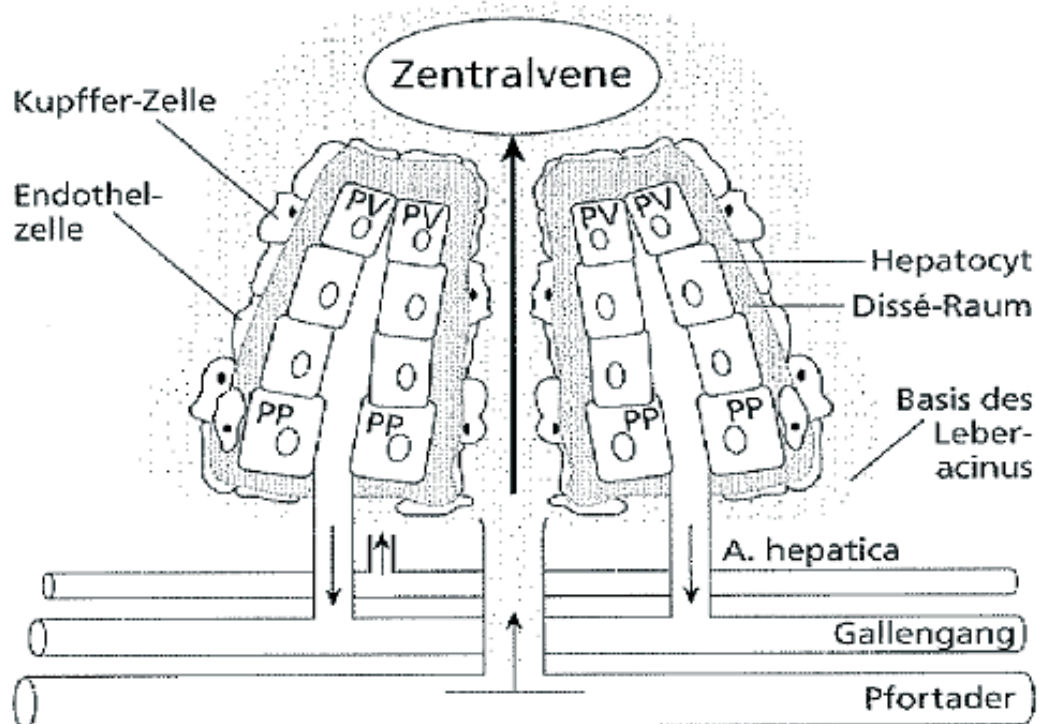


Abb. 1: Bau des Leberläppchens (schematisch). pp, periportal; pv, perivenös. (Abbildung nach v. Engelhard und Breves 2000).

1.3 Funktionelle Einheit des Leberlobulus

Mikroanatomisch kann die Leber folgendermaßen beschrieben werden:

1. Das klassische Modell des Leberläppchens orientiert sich an der mikroskopischen Leberstruktur.

2. Die Beschreibung des Leberazinus nach Rappaport bezieht zusätzlich funktionelle Aspekte mit ein.

1.3.1 Der klassische Leberlobulus

Im idealisierten histologischen Bild wird jedes hexagonale Leberläppchen an seinen Ecken von Portalfeldern begrenzt und hat einen Durchmesser von 0,7 mm und eine Länge von 1,5-2 mm. GLISSON-sche Trias mit Arterie, Vene und Gallengang sind dabei Orientierungspunkte für die Portalfelder. Die Sinusoide liegen zwischen Zellbalken und verlaufen radiär auf die Zentralvene zu. Der Bereich unmittelbar um die Zentralvene herum wird als perivenöse (pv) oder perizentrale Zone bezeichnet, der die Portalfelder umgebende Bereich dahingegen als periportal (pp).

Der Leber-Lobulus wird an der Außenseite von einer geschlossenen Leberzellplatte ("Lamina limitans") umgeben, die nur von den Gefäßen und den Gallengängen unterbrochen wird (Kiernan 1833, Beresford und Henninger 1986). Der Blutfluss im Leberläppchen erfolgt zentripetal, von der Peripherie zur Zentralvene hin. Daraus ergibt sich, dass die in der Peripherie liegenden Hepatozyten zuerst mit Nährstoffen, Sauerstoff und Hormonen versorgt werden und sich die Hepatozyten je nach ihrer Lage im Leberläppchen in ihrer Ausstattung mit Enzymsystemen und auch in ihrer Stoffwechselfunktion unterscheiden. Dadurch können innerhalb des Läppchens verschiedene metabolische Zonen unterschieden werden: in der Läppchenperipherie überwiegen oxidativer Stoffwechsel, Zitratzyklus und β -Oxidation, zentrolobulär finden bevorzugt Glykolyse, Liponeogenese und Ketogenese statt. Die Ausstattung der Zellen unterliegt tagesrhythmischen Schwankungen und passt sich darüber hinaus der jeweiligen Ernährungssituation an (Mac Sween et al. 2002, Van Eyken et al. 1988).

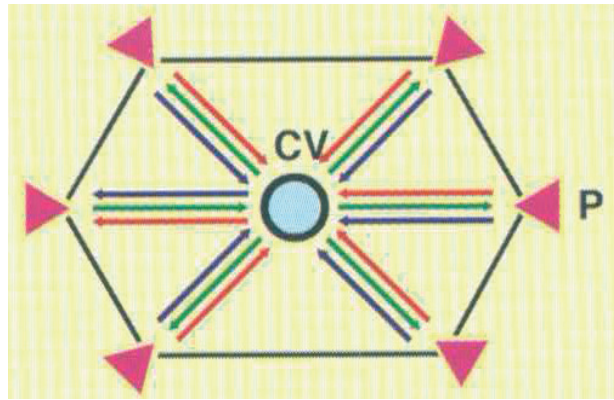


Abb. 2: . Schematische Abbildung des klassischen Leberlobulus. Im periportalen Leberläppchen steht die Lebertrias mit dem zentralen Gallengang und damit der funktionell-sekretorische Drüsencharakter im Mittelpunkt. CV=Zentralvene; P=Portalbereich; Flussrichtung: venöses Blut (blauer Pfeil); arterielles Blut (roter Pfeil); Galle (grüner Pfeil) (Abbildung nach W. Ekataksin et al. 1992).

1.3.2 Der Azinus nach RAPPAPORT

Der Leberazinus nach RAPPAPORT wird von zwei Leberläppchen gebildet. Er besitzt als Zentrum einen zwischen zwei Portalfeldern liegenden Bereich, in dem die zuführenden Arteriolen, Venolen und der Gallengang laufen. Im histologischen Bild hat er Rautenform. Dieses Modell orientiert sich am Gallefluss und hebt die Funktion der Leber als exokrines Organ hervor. Alle unmittelbar an diesen Bereich angrenzenden Hepatozyten werden der periportal Zone (Zone I) zugeordnet. Sie erhalten das nähr- und sauerstoffreiche Blut und entsprechen der peripherlobulären Zone des Leberläppchens. Die im Bereich der Zentralvene liegenden Leberzellen gehören zur periazinären Zone und somit zur Zone III. Alle dazwischen liegenden Leberzellen werden der Zone II zugeordnet. Dieses Modell des Leberaufbaus unterstreicht die heterogene metabolische Funktion der Leberzellen (Rappaport et al. 1954, Rappaport 1973, Rappaport 1976, Rappaport 1980, Rappaport 1982).

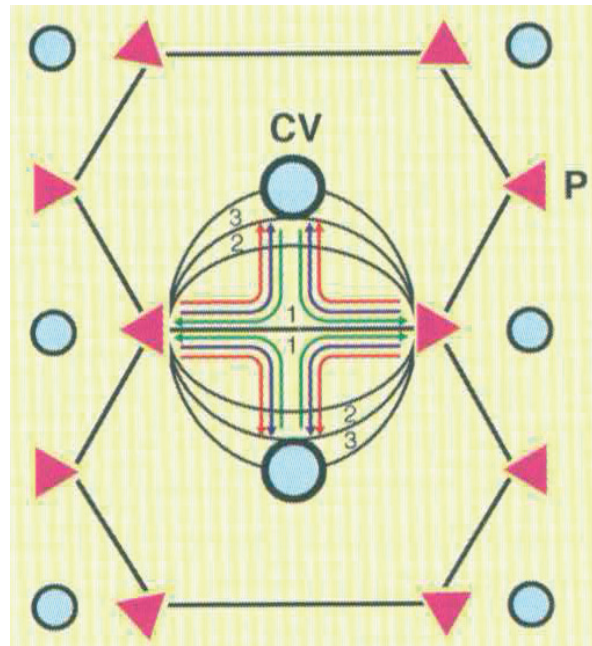


Abb. 3a: Schematische Abbildung des Azinus nach Rappaport. Beim Azinus nach Rappaport stehen die mikrozirkulatorischen Azinus-Zonen 1,2,3 im Mittelpunkt. CV=Zentralvene; P=Portalbereich; Flussrichtung: venöses Blut (blauer Pfeil); arterielles Blut (roter Pfeil); Galle (grüner Pfeil) (Abbildung nach W. Ekataksin et al. 1992).

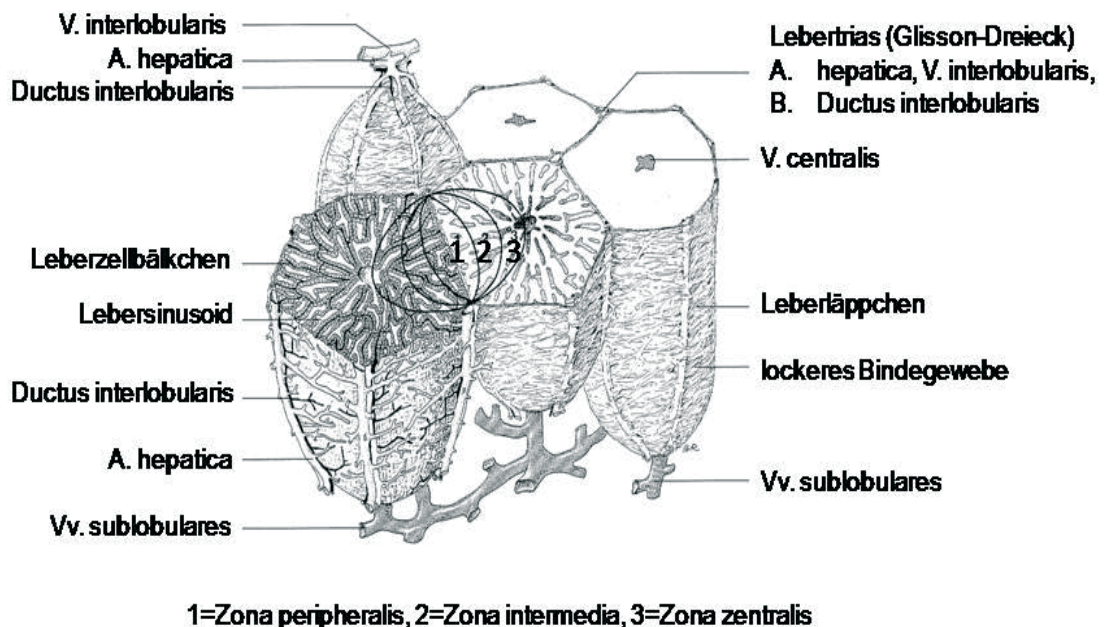


Abb. 3b: Dreidimensionale Rekonstruktion von Leberläppchen. Darstellung der drei stoffwechselaktiven Zonen, mit zuführenden Interlobulärgefäßen und abführenden Vv. sublobulares (Abbildung nach Liebig 1999).

1.4 Physiologie der Leber

Die Leber ist als zentrales Stoffwechselorgan an allen wichtigen Metabolisierungsvorgängen beteiligt. Ein zentrales Ziel ist die Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels. Insulin führt Glukose der Glykogensynthese und -speicherung zu. Glukose muss bei Energiebedarf dagegen durch Glykogenolyse oder durch die Glukoneogenese aus Laktat verfügbar gemacht werden (Alberti et al. 1992). Im Proteinstoffwechsel synthetisieren und katabolisieren die Hepatozyten die meisten Plasmaproteine wie Albumin, Gerinnungsfaktoren, Serumtransportproteine, Proteaseinhibitoren und Enzyme. Eine wesentliche Proteingruppe stellen dabei die Akute-Phase-Proteine dar. Durch den Abbau und die Neusynthese von Eiweißmolekülen reguliert die Leber die Plasmakonzentration vieler Aminosäuren. Aminogruppen werden durch den Umbau zu Harnstoff entgiftet (Felig 1975, Christenden 1982, Rothschild et al. 1988). In perivenösen Leberzellen wird zusätzlich Glutamin zum alternativen Abbau von Ammoniak, welches nicht durch die Harnstoffsynthese gebunden wurde, synthetisiert (Häussinger et al. 1985, Häussinger 1985, Häussinger 1986, Häussinger et al. 1993). Der Fettstoffwechsel und v.a. dessen Störung sind von besonderer Bedeutung. Triglyzeride werden im Dünndarm nach ihrer Emulgation durch Gallensäuren von Pankreaslipasen in Fettsäuren und Monoglyzeride gespalten. In dieser Form werden sie von Enterozyten aufgenommen, in denen dann die Resynthese der Triglyzeride erfolgt. Fettsäuren werden an Albumin gebunden und ebenfalls von der Leber aufgenommen. Bei besonders kohlenhydratreicher Nahrung kann aus Fettsäuren auch Glukose synthetisiert werden (Lazarow 1978, Wakil et al. 1983).

Die Drüsenfunktion der Leber äußert sich in der Sekretion der Galle, die aus Wasser, Elektrolyten, mukösem Sekret der Gallengangsdrüsen, Gallensäuren, Phospholipiden, Cholesterin, Bilirubin und Proteinen (v.a IgA) besteht. Die Gallensäuren werden von der Leber aus Cholesterin gebildet, mit den Aminosäuren Glycin und Taurin konjugiert und aktiv in die Kanalikuli ausgeschieden. Sie haben emulgierende Wirkung, werden zum größten Teil im Ileum zurückresorbiert und über das Blut wieder der Leber zugeführt (entero-hepatischer Kreislauf). Das Bilirubin entsteht dabei aus dem Abbau der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins, dem Häm, das aus gealterten Erythrozyten stammt. Nach einer enzymatischen

Umwandlung entsteht aus dem Hämoglobin das blaugrüne Biliverdin, das durch Reduktion in das orangerote Bilirubin (Bilirubin I) übergeht. Das Bilirubin I ist unkonjugiert und nicht nierengängig. Im Blut wird es an Albumin gebunden und zum großen Teil von Hepatozyten aufgenommen, in denen es an ein Bindungsprotein gekoppelt und zum glatten endoplasmatischen Retikulum transportiert wird. Dort wird es durch die Konjugation mit Glukuronsäure in eine hydrophile Form überführt (Bilirubin II), das abschließend aktiv in die Kanalikuli sezerniert wird. Im Darm wird das Bilirubin II durch Bakterienenzyme dekonjugiert und unkonjugiert wieder reabsorbiert (entero-hepatischer Kreislauf). Ein großer Teil des Bilirubins wird als Urobilinogen über die Niere ausgeschieden. In Hepatozyten wird ferner die Biotransformation vieler endogener (u.a. Steroide, Gallensäuren, Eicosanoide) und exogener (Xenobiotika) Substanzen durchgeführt (Perwaiz et al. 2001, Redinger 2003, Kullak-Ublick et al. 2004).

Die metabolische Zonierung im Leberlobulus:

periportal	perivenös
Glukoneogenese aus Aminosäuren und Laktat	Glykolyse
Fettsäureoxidation, Ketogenese, Citratzyklus	Glykogensynthese aus Glukose
Harnstoffsynthese	Glutaminsynthese
Cholesterinsynthese	Fettsäuresynthese
	Gallensäuresynthese

1.5 Hepatozellulärer Transport von Gallensalzen und organischen Anionen

Hepatozyten exprimieren als polarisierte Zellen die unterschiedlichen Transportsysteme in ihrer basolateralen (sinusoidalen) und apikalen (kanalikulären) Plasmamembran. Die Transporter spielen eine entscheidende Rolle, sowohl bei der Aufnahme von gallepflichtigen Substanzen über die basolaterale Membran, die in direktem Kontakt zu den Sinusoiden steht, als auch bei der Abgabe von Stoffen über die kanalikuläre Membran in den Gallenkanalikus. Unter physiologischen Bedingungen werden die Gallensalze vor allem von Hepatozyten in der Zone 1 aus dem sinusoidalen Blut gefiltert, die Leberzellen in Zone 3 werden ausschließlich bei einem höheren Aufkommen von Gallensalzen genutzt (Anwer 1993, Anwer 1998, Sherlock und Dooley 2002). Gallensalze sind die entscheidenden Substanzen für den gallensalzabhängigen Gallefluss. Die Gallesekretion erfolgt wegen der hohen Konzentration an Gallensalzen in der Galle gegen einen Konzentrationsgradienten und stellt somit einen aktiven Transport dar, dem Wasser und Elektrolyte passiv folgen. Die intensive Regulation der Galleausscheidung steht in engem Zusammenhang mit dem physiologischen Transport von Endo- und Xenobiotika (z.B. Cholesterin, Bilirubin) und wird durch die Modulation der konstitutiven Expression, dynamischen Lokalisation oder intrinsischen Aktivität von relevanten Transportsystemen ermöglicht (Correia und Castagnoli 1987, Tredger und Davis 1991, Anwer 1993, Anwer 1998). Es kann zwischen einer kurzfristigen und einer langfristigen Transporterregulation unterschieden werden. Die „Kurzzeit“-Regulation wird durch eine von Vesikeln vermittelte Transporterinsertion in die Plasmamembran reguliert. Die Membrantransporter werden in einem endosomales Kompartiment gespeichert und können bei steigendem Bedarf wieder aus diesem freigesetzt und in die Hepatozytenmembran eingebaut werden. Bei der „Langzeit“-Regulation wird die Expression von Membrantransportern über Transkriptions- und Translationsprozess reguliert und dadurch das Verhältnis von Transporterneusynthese- und abbau verschoben. Dieser Prozess ist irreversibel; benötigte Membrantransporter können nur mit einer zeitlichen Verzögerung bereitgestellt werden (Trauner und Boyer 2003, Roma et al. 2008).

1.5.1 Basolaterale Aufnahme von Gallensalzen und organischen Anionen

Der basolaterale Transport von Gallensalzen und organischen Anionen in die Hepatozyten erfolgt durch aktive Aufnahmemechanismen. Sie werden durch Natrium-abhängige (Ntcp) und Natrium-unabhängige (Oatp-Familie) Transporter vermittelt werden.

1.5.1.1 Natrium-abhängige Aufnahme von Gallensalzen

“Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide“ (Ntcp)

Durch den enterohepatischen Kreislauf werden Gallensalze mit dem sinusoidalen Blut zu den Leberzellen transportiert. Der Natrium-abhängige Co-Transport von konjugierten Gallensalzen und Natrium wird durch einen Na⁺-Gradienten der Na⁺/K-ATPase aufrecht erhalten. Mehr als 80 % der Taurocholataufnahme, aber weniger als 50 % der Cholataufnahme in die Hepatozyten sind Natrium-abhängig (Stanca et al. 2001). Das dominierende Aufnahmesystem für Gallensalze aus dem portalen Blut in die Leberzelle ist das “Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide“ (Ntcp) [Trauner und Boyer 2003]. Dieser Transporter befindet sich in der basolateralen Membran und ist homogen über den Leberlobulus verteilt (Trauner und Boyer 2003, Stanca et al. 2001). Die Natrium-abhängige Aufnahme von Gallensalzen wird in der Rattenleber fast ausschließlich über Ntcp reguliert. Ntcp wird in intrazytoplasmatischen Vesikeln gespeichert. Diese dienen als Reservoir und ermöglichen so unter physiologischen Stimuli den schnellen Einbau von Transportmolekülen in die sinusoidale Membran (Stanca et al. 2001). Ntcp besteht aus 362 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 51 kDa (Hagenbuch und Meier 1994, Cohn et al. 1995). Er ist an zwei Seiten NH₂-glycosyliert und besteht aus 7 Transmembrandomänen mit zwei Segmenten, die entweder eine große extrazelluläre Schleife bilden oder mit der Membran assoziiert sind (Hagenbuch und Meier 1994, Mareniniva et al. 2005). Die Transportaktivität erfolgt über einen elektrochemischen Gradienten, mit einem 2:1 Verhältnis von Na⁺ zu Gallensalzen. Ntcp transportiert alle physiologischen Gallensalze (konjugiert und unkonjugiert). Die höchste Affinität besteht für konjugierte Di- und Trihydroxygallensalze, ferner für

Östrogenkonjugate, sulfatierte Steroidhormone und Schilddrüsenhormone (Döring et al. 2012). Die Expression von Ntcp wird durch hohe Konzentrationen von Gallensalzen über FXR transkriptionell reguliert (Karpen S.J. 2002, Chiang J.Y. 2003). Die Expression der Ntcp mRNA und die Proteinexpression sind bei allen bekannten Modellen der experimentellen Cholestase oder der Leberfunktionsstörung reduziert (Geier et al. 2007).

1.5.1.2 Natrium-unabhängige Aufnahme von Gallensalzen und organischen Anionen “Organic-Anion-Transporting-Polypeptides” (Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2)

Der Natrium-unabhängige Transport von Gallensalzen wird primär durch den Austausch von intrazellulären Anionen (GSH, HCO_3^-) über Isoformen der Familie der “Organic-Anion-Transporting-Polypeptids” (Oatp) gewährleistet. Die Oatp-Familie ist eine Transporterfamilie, die amphipatische, an Albumin gebundene Substanzen transportiert und ein breites Substratspektrum besitzt (Kullak-Ublick et al. 2001, König et al. 2006, Hagenbuch und Gui 2008). Anders als der Na^+ -abhängige Transport macht der Natrium-unabhängige Gallensalztransport quantitativ einen viel kleineren Anteil aus (Stanca et al. 2001).

An der Gallebildung sind jedoch die basolateralen Gallensalzaufnahmesysteme zu ca. 95 % beteiligt (Trauner und Boyer 2003). Die Transporter der Oatp-Familie haben ein weites Substratspektrum und transportieren zusätzlich zu konjugierten und unkonjugierten Gallensalzen noch andere cholephile Substanzen, z.B. glukuronidiertes Bilirubin oder exogene organische Anionen. Der Anteil der transportierten Gallensalze ist geringer als bei Ntcp (Meier et al. 1997, Kullak-Ublick et al. 2000, 2001, König et al. 2006).

In der Rattenleber wird die basolaterale Na^+ -unabhängige Gallensalzaufnahme von drei Mitgliedern der Oatp-Familie vermittelt. Alle Oatp-Transporter sind Glycoproteine, die zwölf Transmembrandomänen besitzen. Im Gegensatz zu Ntcp werden die Transporter der Oatp-Familie nicht in intrazellulären Vesikeln gespeichert, wodurch ihre Induktion nur durch verstärkte Transkription möglich ist (Trauner und Boyer 2003). Die Isoformen der Oatp-Familie sind im Hepatozyten basolateral lokalisiert. Oatp1a1 wird in den basolateralen Membranen der Hepatozyten und im Leberlobulus homogen exprimiert, existiert aber auch in proximalen Tubuluszellen der Niere und in den Epithelzellen des Plexus choroideus

(Kullak-Ublick et al. 1995, Bergwerk et al. 1996, Angeletti et al. 1997). Dieser Transporter besteht aus 670 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa (Jacquemin et al. 1994). Er transportiert ein breites Spektrum von organischen Anionen, konjugierte und unkongugierte Gallensalze, Bilirubinmonoglukuronide, aber kein unkongugiertes Bilirubin (Trauner und Boyer 2002), außerdem Schilddrüsenhormone, Steroidhormone und ACE-Hemmer (Geier 2006). Der Transport von organischen Anionen erfolgt im Austausch mit Glutathion (Li et al. 1998). Oatp1a1 wird über die Kernrezeptoren HNF-4 α und HNF-1 α reguliert (Trauner und Boyer 2003). Die treibende Kraft für den Oatp1a1 vermittelten Substrattransport ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Stanca et al. 2001).

Im Gegensatz zu Oatp1a1 stellt sich Oatp1a4 primär zoniert im Leberazinus dar. Dies bedeutet eine zonierte basolaterale Expression v.a. in perivenösen und midzonalen Hepatozyten. Die inneren 1-2 Zelllagen, um die Zentralvenen herum, zeigen dabei keine signifikante Expression von Oatp1a4 (Reichel et al. 1999). Oatp1a4 besteht aus 661 Aminosäuren und hat 77 % Aminosäureidentität zu Oatp1a1; sein Molekulargewicht beträgt 92 kDa (Stanca et al. 2001, Trauner und Boyer 2003). Der Transporter hat eine ähnliche Substratspezifität für organische Anionen und Gallensalze wie Oatp1a1, darüber hinaus aber auch noch eine hohe Affinität zu Digoxin und Bilirubinmonoglucuroniden (Geier et al. 2006). Außerhalb der Leber wird Oatp1a4 noch im Gehirn und in der Retina exprimiert (Gao et al. 1999). Seine Expression ist abhängig von den nukleären Rezeptoren PXR und HNF-1 α (Hagenbuch und Dawson 2004, Meyer zu Schwabedissen et al. 2008).

Oatp1b2 ist heterogen über den Leberazinus verteilt und zeigt eine hohe Expression in Hepatozyten der Zone 2 und Zone 3. Er besteht aus 691 Aminosäuren und ist in der Aminosäuresequenz zu 43 % mit Oatp1a1 und zu 44 % mit Oatp1a4 identisch; sein Molekulargewicht beträgt 85 kDa. Die Substrate von Oatp1b2 umfassen ein breites Spektrum von Gallensalzen (Abe et al. 1999, 2001, Cui et al. 2001, Letschert et al. 2004) Prostaglandin E2, Östrogenkonjugate (König et al. 2000a, b) und Schilddrüsenhormone (Abe et al. 1999, Kullak-Ublick et al. 2001, Omote et al. 2006). Ebenso wie Oatp1a1 und Oatp1a4 wird auch Oatp1b2 durch den Kernrezeptor HNF-1 α reguliert (Trauner und Boyer 2003).

1.5.2 Kanalikuläre Sekretion von Gallensalzen und organischen Anionen

Nach transzellulärem, an hochaffine zytosolische Proteine gebundenem Transport der gallepflichtigen Substanzen, werden diese durch ATP-abhängige Pumpen der ATP Superfamilie, sogenannter “ATP-binding cassette Transporter” (ABC-Transporter), in die Galle sezerniert. Die kanalikuläre Exkretion von cholephilen Substanzen macht 75 % des täglich produzierten Gallevolumens aus und stellt den geschwindigkeitslimitierenden Faktor der Gallesekretion dar (König et al. 1999, Keppler et al. 2001, Fromm 2003). Durch die Hydrolyse von ATP werden gallepflichtige Substanzen gegen ein Konzentrationsgefälle, das bis zu einem 1000-fachen der hepatozellulären Konzentration beträgt, transportiert. Alle ABC Transporter besitzen mindestens zwölf Transmembrandomänen, durch die ihre Substratspezifität bestimmt wird. Zur Bindung und Hydrolyse des ATP dienen darüber hinaus zwei intrazelluläre Loops (Stieger und Meier 2002). Zu den ABC-Transportern, die sich in ihrer Membranstruktur, Substratspezifität und intrazellulären Lage unterscheiden, gehören u.a. die “Bile salt export pump” (Bsep) und das Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (Mrp2). Die ABC-Transporter vermitteln den kanalikulären Efflux von divalenten, bipolaren sulfatierten oder glukuronidierten Gallensalzen.

1.5.2.1 “Bile salt export pump” (Bsep)

Der Membrantransporter Bsep, der ATP-abhängig Gallensalze durch die kanalikuläre Membran aus den Hepatozyten in die Galle transportiert ist der geschwindigkeitsabhängige Transporter bei der Sekretion von Gallesalzen aus dem Blut in die Galle. Die kanalikuläre Gallensalzkonzentration ist 1000-fach höher als in Hepatozyten, was einen aktiven Transport durch die kanalikuläre Hepatozytenmembran erfordert (Gerloff et al. 1998).

Er spielt eine entscheidende Rolle beim enterohepatischen Kreislauf der Gallensalze. Die kanalikulären Exportpumpen werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und in Vesikeln durch den Golgi-Komplex an die apikale Membran gebracht. Bsep besteht aus 1321 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 160 kDa. Physiologischerweise ist der Transporter homogen im Leberazinus verteilt

und wird auf der Oberfläche von kanalikulären Mikrovilli exprimiert (Gerloff et al. 1998, Green et al. 2000, Byrne et al. 2002). Ebenso wie andere Transporter der ABC-Superfamilie besteht auch dieser aus zwölf transmembranären Domänen und zwei großen zytoplasmatischen, Nukleotid-bindenden Domänen (Lam et al. 2010). Bsep vermittelt die Exkretion von monovalenten und divalenten konjugierten Gallensalzen und hat geringe Affinität zu Substraten von MDR1 ("Multidrug Resistance Protein 1"). Konjugierte Gallensalze dienen nicht nur als Substrate, sie können auch die ATPase aktivieren. Die durch Bsep vermittelte vektoriale Ausscheidung der Gallensalze in die Galle ist ATP- abhängig und dadurch die entscheidende Größe für den "Gallensalz-abhängigen" Gallefluss. Wie auch Ntcp wird Bsep aufgrund verschiedener Stimuli aus der apikalen Membran in intrazelluläre, sub-apikale, Vesikel endozytiert (Gerloff et al. 1998). Der Ein- und Ausbau von Bsep erfolgt unter Beteiligung des mikrotubulären Zytoskeletts. Die Expression von Bsep wird von den Zellkernrezeptor FXR und HNF-4 α reguliert. Dabei fungieren auch Gallensalze als Liganden für FXR und können dadurch die Transkription von Bsep induzieren (Ananthanarayanan et al. 2001, Plass et al. 2002, Schuetz et al. 2001).

1.5.2.2 Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (Mrp2)

Mrp2 ist eine Exportpumpe für organische Anionen, die als einzige an der apikalen Membran polarisierter Zellen lokalisiert ist. Dieser Transporter befindet sich insbesondere in der kanalikulären Membran von Hepatozyten, den Epithelzellen der Gallenblase, in proximalen Tubuluszellen in der Niere, Enterozyten und in der Plazenta (Keppler und Kartenbeck 1996, Paulusma et al. 1997, Rost et al. 2001). Mrp2 hat teilweise überlappende Substratspezifität mit dem basolateralen Mrp3, transportiert aber z.B. GSH-Konjugate effizienter (Rost et al. 2001). Das Mrp2-Protein besteht aus 1545 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 190 kDa (Stanca et al. 2001). Der Transporter vermittelt die ATP-abhängige Sekretion endogener und xenogener lipophiler Substanzen, die mit Glutathion, Glukuronat und Sulfaten konjugiert sind, ferner Östradiolkonjugate, Bilirubinglukuronide sowie den Export von unkonjugierten organischen Anionen (Cui et al. 1999, Paulusma et al. 1999, Jedlitschky et al. 2006). Unter physiologischen Bedingungen ist Mrp2 zonal

gleichmäßig verteilt und für den gallensalzunabhängigen Gallefluss verantwortlich (Trauner und Boyer 2003). In vielen Modellen der experimentellen Cholestase zeigt sich eine Herabregulation der Mrp2 mRNA (Transkription) und des Mrp2 Proteins (Translation). Wie auch bei Ntcp und Bsep kann Mrp2 dynamisch durch Endozytose von der kanalikulären Membran in den intrazellulären Pool im subapikalen Raum verlagert werden, was eine sehr kurzfristige Regulation des Transporters ermöglicht (Jedlitschky et al. 2006). Mrp2 wird durch die Kernrezeptoren PXR, FXR und CAR induziert (Kast et al. 2002, Jedlitschky et al. 2006, Simon et al. 2007).

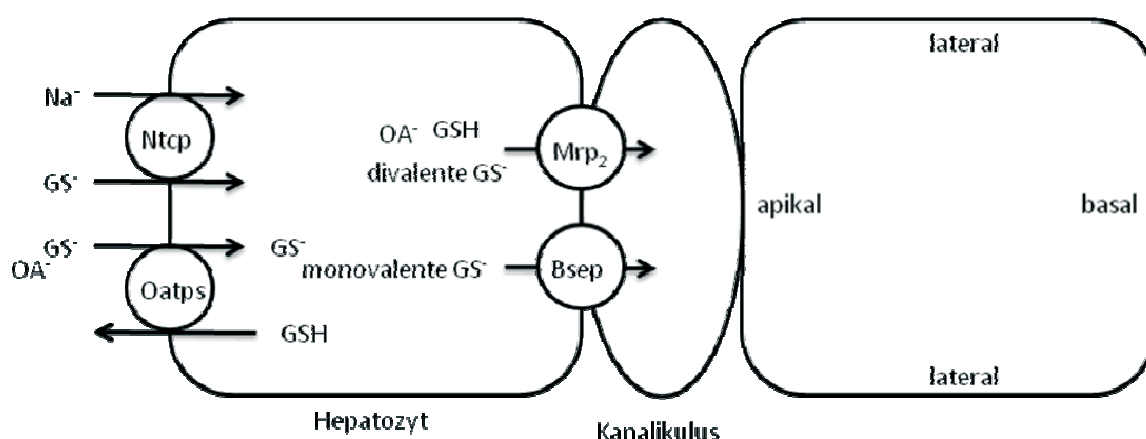


Abb. 4: Lokalisation und Funktion von sinusoidalen und kanalikulären hepatozellulären Transportern in der Rattenleber. Die Na^+ -abhängige sinusoidale Aufnahme von Gallensalzen wird durch Ntcp vermittelt. Die Na^+ -unabhängige Aufnahme von organischen Anionen (OA^-) und Gallensalzen (GS^-), wird durch Mitglieder der Oatp- Familie vermittelt. Der Transport über die kanalikuläre Membran wird durch ATP-abhängige Exportpumpen bewerkstelligt. Bsep vermittelt den apikalen Transport von Gallensalzen. Mrp2 transportiert organische Anionen, wie Bilirubinglukuronide, GSH sowie sulfatierte und glukuronidierte Gallensalze (Abbildung nach Roma et al. 2008).

1.6 Hämoxygenase-1 (HO-1)

Die Hämoxygenasen spielen eine zentrale Rolle bei der Mengenregulation von intrazellulärem Häm. Die Enzyme spalten Häm oxidativ zu Biliverdin, freiem Eisen und CO, die sich in verschiedenen Studien als zellprotektiv, antioxidativ, antiinflammatorisch, antithrombotisch, antiproliferativ und antiapoptotisch gezeigt haben (Kim et al. 2012). Es sind drei Isoformen der HO bekannt, die von verschiedenen Genen exprimiert werden und dadurch unterschiedliche

Gewebeverteilungen und Eigenschaften aufweisen. Die HO-1 ist die induzierbare Form und das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Metabolisierung von Häm. Sie hat ein Molekulargewicht von 32 kDa, 288 Aminosäuren und ist ein Hitzeschockprotein (HSP 32), dass unter physiologischen Bedingungen fast ausschließlich in Kupffer-Zellen exprimiert wird (Volti et al. 2008). Die Induktion der HO-1 reduziert nach Ischämie und Reperfusion der Leber die Enzyme AST und LDH. Der Gallefluss wird dahingegen gesteigert und dadurch der histologische Reperfusionsschaden gemildert (Redaelli et al. 2002). Die HO-1 hat ein breites Spektrum von Induktoren wie u.a. Metalle, Zytokine, Endotoxine, Oxidantien, NO und vasoaktive Stoffe (Kim et al. 2012). Die HO-2 wird konstitutiv, vorzugsweise in Leberparenchymzellen exprimiert. Ihr ähnelt auch sehr die HO-3, die aber eine sehr viel geringere katalytische Aktivität besitzt und beim Menschen nicht exprimiert wird (Kim et al. 2012).

Unter physiologischen Bedingungen wird die HO-1 zum kleinsten Anteil produziert, wird aber durch Stimulation mit LPS auch in Monozyten, Gewebemakrophagen und Hepatozyten induziert. Die HO-1 spaltet die α -meso Carbonbrücken des Häms. Dieser Prozess kann durch verschiedene Metalloporphyrine gehemmt ("tin protoporphyrin", SnPP) und auch induziert ("cobalt protoporphyrin", CoPP) werden (Redaelli et al. 2002). Ursprünglich wurde angenommen, dass die zentrale Rolle der HO-1 der Abbau des hoch oxidativen Häms ist. Es hat sich inzwischen jedoch gezeigt, dass dieses System und die aus ihm hervorgehenden Moleküle auch eng mit der Regulation von vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen verknüpft sind. Die Induktion der HO-1 muss somit auch als eine Antwort auf oxidativen Stress, Apoptose, Hyperthermie und Entzündung verstanden werden (Kim et al. 2012). Die durch hämorrhagischen Schock, z.B. als Folge von Ischämie und Reperfusion, verursachte Leberdysfunktion bis hin zu akutem Leberversagen, bedingt eine verminderte Mikrozirkulation und erzeugt eine hepatozelluläre Überexpression von HO-1 (Volti et al. 2008). Eine bedeutende Rolle nimmt dabei nicht nur das antioxidativ wirkende Bilirubin, sondern auch das entstehende CO ein, das u.a. die sinusoidale Perfusion verbessert und Vasokonstriktion vermindert. CO reduziert außerdem die mRNA Expression von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und NOS. Darüber hinaus wird die Bildung freier Radikale bei der Re-Oxygenierung von hypoxischen Zellen reduziert (Volti et al. 2008). Die Funktion des Spenderorgans und damit die

Überlebensrate nach Transplantation wird durch die Überexpression der HO-1 deutlich gesteigert, da diese zu den bereits genannten Eigenschaften auch immunsuppressive Effekte besitzt (Redaelli et al. 2002).

1.7 Transporterregulation bei Cholestase

Die dynamische Lokalisation und Endozytose von hepatozellulären Transportern ist eine häufige Reaktion auf Leberfunktionsstörungen wie z.B. Cholestase. Dabei kann eine extrahepatische Cholestase durch die Obstruktion der ableitenden Gallenwege, eine intrahepatische Cholestase dahingegen z.B. durch Arzneimittel, Toxine, systemische Entzündung oder Cholangitis ausgelöst werden. Die Veränderung der Transporterlokalisierung erklärt das sekretorische Versagen der Hepatozyten (Roma et al. 2008). Veränderungen in der Transporterexpression sind darüber hinaus auch durch veränderte Zellpolarität, Störungen in Zell-zu-Zell-Verbindungen und zytoskeletalen Veränderungen zu erklären (Geier et al. 2006).

1.7.1 “Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide” (Ntcp)

Im Modell der obstruktiven Cholestase wurde gezeigt, dass durch hohe portale Gallensalzkonzentrationen die Natrium-abhängige Gallensalzaufnahme entlang des Leberazinus angepasst und so die periportalen Hepatozyten vor schädlich hohen Gallensalzkonzentrationen geschützt werden (Trauner et al. 1998, Lee et al. 2000, Arrese et al. 2003). Die bei obstruktiver Cholestase akkumulierten Gallensalze sind als Effektor für die transkriptionelle Herabregulation von Ntcp durch die Hemmung der Kernrezeptoren HNF-1 alpha und HNF-4 alpha beschrieben worden (Trauner et al. 1998, Arrese et al. 2003). Zusätzlich wird Ntcp durch Gallensalze PKC-abhängig endozytiert (Meier und Stieger 2000).

Die mit der obstruktiven Cholestase assoziierte Aktivierung scheint für die posttranskriptionellen und posttranslatorischen Herabregulation von Ntcp keine Rolle zu spielen (Geier et al. 2005). Eine Herabregulation wird auch durch Endotoxin ausgelöst, wie es im Modell der experimentellen Sepsis gezeigt wurde (Gartung et al. 1996). Die den Effekt vermittelnden Zytokine sind bisher aber nicht bekannt (Geier et al. 2005).

1.7.2 “Organic-Anion-Transporting-Polypeptides”

(Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2)

Oatp1a1 wird im Gegensatz zu Oatp1a4 und Oatp1b2 bei obstruktiver Cholestase und unter dem Einfluss von TNF- α herabreguliert (Geier et al. 2007). Die Taurocholat- und Cholataufnahme ist jedoch unter obstruktiver Cholestase unverändert. Um dieses Phänomen zu erklären, gibt es 2 Möglichkeiten: Entweder ist Oatp1a1 für den Transport nicht entscheidend, oder Oatp1a4 und Oatp1b2 sind in der Lage den Ausfall zu kompensieren (Geier et al. 2007). Oatp1a4 wird durch Östrogene (Geier et al. 2007) herabreguliert, durch extrahepatische Cholestase (BDL) in periportalen Hepatozyten jedoch induziert (Donner et al. 2007). Ethinylöstradiol führt zu einer reduzierten Transporterexpression von Oatp1a1 und Oatp1a4 (Rost et al. 2005). Der Einfluss von Gallensalzen während obstruktiver Cholestase ist dahingegen noch immer unbekannt (Geier et al. 2007). Vorherige Studien haben jedoch gezeigt, dass die Oatp1a1 Transporter in der experimentellen Sepsis in periportalen Hepatozyten reduziert, Oatp1b2 dahingegen durch Gallengangsligatur induziert wird (Donner et al. 2007).

1.7.3 “Bile salt export pump“ (Bsep)

Bei den verschiedenen Cholestaseformen, z.B. induziert durch LPS, Endotoxine und oxidativen Stress, führen proinflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies aus Makrophagen zu einer Internalisierung von Bsep in intrazelluläre Vesikel an der kanalikulären Membran (Lee et al. 2000, Roma et al. 2008). Das führt zu einer Veränderung des Membransignals in der Immunfluoreszenz, was auf eine Umverteilung der Transporter in die intrazellulären Vesikel im subapikalen Raum hindeutet. Diese veränderte Lokalisation von Bsep führt zu einer sekretorischen Dysfunktion, die proportional ist zu der Abnahme der hepatozellulären Transportermenge in der kanalikulären Membran (Roma et al. 2008). Oxidativer Stress ist dabei ein wichtiger, zu Leberschädigung führender Faktor bei Lebererkrankungen verschiedener Ätiologie. Experimentell konnte gezeigt werden, dass bei obstruktiver Cholestase die Bsep Expression durch TNF- α und IL1 β reduziert wird, was einer Reduktion der Belastung von Cholangiozyten mit

Gallensalzen dient (Donner et al. 2007).

1.7.4 Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (Mrp 2)

Durch unterschiedliche Stimuli wie obstruktiver Cholestase, Endotoxämie, anabole Steroide, Septikämie, oxidativer Stress oder LPS wird die kanalikuläre Expression von Mrp2 reduziert (Trauner et al. 1997). Die Schlüsselmediatoren sind durch bakterielles LPS induzierte proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL- β . LPS führt bereits nach 20 Minuten zur Endozytose von Mrp2 aus der kanalikulären Membran in intrazelluläre Vesikelstrukturen (Paulusma et al. 2000, Donner et al. 2004, Roma et al. 2008). Die Expression erreicht 24 Stunden nach Reperfusion ein Minimum und ist nach 48 Stunden reversibel (Tanaka et al. 2006), die Exkretion von Gallensalzen aus dem Plasma ist jedoch erst nach 7 Tagen normalisiert (Accatino et al. 2003). Durch eine Reduktion der Kupfferzelldepletion wird die nicht-nekrotische hepatozelluläre Dysfunktion vermindert und die Funktion von Mrp2 bleibt erhalten (Kudo et al. 2004). Wie Bsep zeigt auch Mrp2 bei obstruktiver Cholestase Veränderungen in der Signalintensität und Verteilung in den Hepatozytenmembranen (Roma et al. 2008). Klinisch findet sich nach Herabregulation von Mrp2 eine Hyperbilirubinämie und eine reduzierte hepatozelluläre Clearance weiterer endogener, potentiell toxischer Substanzen (Roma et al. 2008).

1.8 Lebertransplantation und Cholestase

1.8.1 Entwicklung der Organtransplantation

Durch die Etablierung der Transplantation von Organen, wie Leber, Niere und Lunge, ist eine operative Therapie vieler zuvor infauster Erkrankungen möglich geworden. Carrel und Guthrie reimplantierten erstmalig Ende der 80er Jahre Nieren in Katzen mit einer mittleren Überlebenszeit von drei Wochen. Obwohl die Herztransplantation seit Ende der 40er Jahre experimentell erarbeitet wurde, konnte erst im Jahre 1964 die erste humane Herztransplantation durchgeführt werden (Hardy et al. 1964). Das dabei transplantierte Schimpansenherz versagte bereits nach wenigen Stunden. Im Jahre 1967 führte Christiaan Bernard die erste erfolgreiche Herztransplantation am

Menschen durch. Hardy und Webb transplantierten 1963 die erste Lunge. Der Patient starb nach drei Wochen aufgrund von akutem Nierenversagen (Hardy et al. 1963).

Erste tierexperimentelle Arbeiten mit dem Versuch der Lebertransplantation begannen Ende der 50er Jahre (Welch 1955, Cannon 1965). Die erste Lebertransplantation am Menschen gelang Starzl 1963 in Colorado an einem dreijährigen Kind mit Gallengangatresie (Starzl et al. 1963). Starzl operierte auch 1967 erfolgreich ein Kind, das vierhundert Tage überlebte. 1968 wurde von Gütgemann in Bonn die erste Lebertransplantation in Deutschland durchgeführt. Dahingegen hat die Übertragung anderer Organe wie z.B. Pankreas, Dünndarm, Gebärmutter oder Eierstöcken bisher kaum Bedeutung erlangt.

Bis Ende der 70er Jahre war die Möglichkeiten der Immunsuppression auf die Kombination von Azathioprin, Kortikosteroiden und Antilymphozytenglobin beschränkt. Etwa ein Drittel der lebertransplantierten Menschen überlebten nur ein Jahr (Starzl et al. 1981). Durch die klinische Einführung von Cyclosporin A, vor 30 Jahren, konnte die Einjahres - Überlebensrate mehr als verdoppelt werden (Starzl et al. 1985b). Dadurch trat die Organkonservierung als weiterer kritischer Faktor für den Erfolg der Transplantation in den Vordergrund.

1.8.1.1 Entwicklung der Lebertransplantation

Durch die Fortschritte auf den Gebieten der Organkonservierung, der Immunsuppression und der chirurgischen Technik, konnte sich die Lebertransplantation als therapeutische Methode etablieren (Starzl et al., 1985a, Starzl et al. 1985b, Belzer und Southard 1988). Anfang der 80er Jahre noch war dieser chirurgische Eingriff die letzte therapeutische Option für Patienten mit einer Lebererkrankung im Endstadium. Aufgrund der präoperativen Morbidität war jedoch die Langzeitprognose schlechter als bei den heute operierten Patienten (Shaw et al. 1989). Zeichen der voranschreitenden Entwicklung weltweit waren die Entstehung vieler Transplantationszentren in den 80er Jahren und die enorme Zunahme an transplantierten Organen. International agierende Organisationen wie "Eurotransplant" organisieren möglichst effizient den Organaustausch zwischen vielen Ländern in Europa und über große Entfernungen. Trotz dieser verbesserten

therapeutischen Möglichkeiten warten bei konstanten Spenderzahlen zunehmend mehr potentielle Empfänger auf ein Organ, was die Verteilung der verfügbaren Organe nach der größten Transplantationserfolgswahrscheinlichkeit notwendig werden lässt. Insbesondere in der Pädiatrie werden heute aber auch erfolgreich Teil-Leber-Transplantationen ("reduced bzw. split-liver") durchgeführt, wodurch die Diskrepanz zwischen Organbedarf und Organangebot etwas kleiner wird (Gruttadauria 2009).

1.8.1.2 Hepatischer Konservierungsschaden

Der Konservierungsschaden ist entscheidend für die initiale Nichtfunktion und auch für mögliche spätere Abstoßungsreaktionen des Transplantats (Howard 1990).

Man kann den Konservierungsschaden in vier Phasen einteilen (Erhard et al. 1994):

1. Vorkonservierungsschaden
2. Kaltkonservierungsschaden
3. Erwärmungsschaden
4. Reperfusionsschaden

Ein möglicher Vorkonservierungsschaden kann durch leberschädigende Gewohnheiten des Spenders, durch traumatische Leberschädigung oder durch eine präoperative hypotensive Kreislauftsituation entstehen. Für den Konservierungs- und Reperfusionsschaden ist dahingegen zum großen Teil die Hypothermie während der Kaltkonservierung verantwortlich.

Die Hypothermie verursacht verschiedene Effekte an den Hepatozyten, u.a. wird die zelluläre metabolische Aktivität herabgesetzt. Es kommt bei der Konservierung ferner zu einem Substrat- und ATP-Verlust in den Leberzellen, weil die fortlaufenden, wenn auch durch die Kaltlagerung stark verlangsamten Stoffwechselprozesse mehr Energie verbrauchen als unter anaeroben Bedingungen nachgebildet werden kann (Harvey et al. 1988). Die Synthese von ATP über anaerobe Glykolyse erzeugt eine intrazelluläre Azidose (Waud und Rajagopalan 1976). Der ATP-Mangel beeinträchtigt außerdem die Funktion der Natrium/Kalium-ATPase. Es kommt zu einer intrazellulären Natrium-Anreicherung mit Verlust des Ladungsgefälles. Chlorid strömt

in die Zelle ein, während Kalium heraustransportiert wird. Durch diese Elektrolytverschiebung strömt H_2O in die Zelle und es bildet sich ein intrazelluläres Ödem (Martin et al. 1972). Während der Erwärmung und Reperfusion mit oxigeniertem Blut kommt es weiterhin zur Sauerstoffradikalbildung mit darauf folgender ausgeprägter Entzündungsreaktion. Die zeitliche Spanne der warmen Ischämiezeit zwischen Kaltkonservierung und Reperfusion hat einen negativen Einfluss auf die spätere Organfunktion (Kamiike et al. 1988, Cisneros et al. 1991). Zusätzlich gibt es an den Sinusendothelien perfusionsbedingte Schädigungsmechanismen (Bell et al. 1997). Dabei korreliert der Leberschaden der kalten Ischämie mit dem Ausmaß der nach der Konservierung noch vorhandenen Adhäsion der Hepatozyten mit den Sinusendothelzellen (Mc Keown et al. 1988). Bei Anwesenheit von aus den Leberzellen freigesetzter Glucose spielt die Hypoxie während der Ischämie durch die glykolytische Kapazität der Endothelzellen keine entscheidende Rolle. Dahingegen kommt es während der Reperfusion zur Adhärenz von Leuko- und Thrombozyten am Endothel, was wahrscheinlich durch Kupffer-Zellen vermittelt wird. Die an den Sinusendothelzellen anhaftenden neutrophilen Granulozyten setzen wiederum Proteasen und Sauerstoffradikale frei, die zusätzlich eine Kaskade von Entzündungsmediatoren antreiben. Als Folge kommt es zu einer eingeschränkten Mikrozirkulation und darauf folgender Schädigung der Sinusendothelien mit Ablösung der Endothelzellen von der extrazellulären Matrix und Apoptose (Holloway et al. 1990). Insgesamt entscheidet die Schädigung der Leber während der Kaltkonservierung und nachfolgende Reperfusion durch die genannten Mechanismen zu einem großen Teil über das Ausmaß des gesamten Konservierungsschadens (Cisneros et al. 1991, Kamiike et al. 1988).

1.8.1.3. Mechanismen der Cholestase nach Ischämie und Reperfusion der Leber

Eine der vielfältigen Ursachen für die Entstehung einer intrahepatischen Cholestase ist die vorübergehende Ischämie mit nachfolgender Reperfusion, wie es bei der Lebertransplantation oder aber auch nach Thrombembolien zu beobachten ist. Die Ischämie führt zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff und erforderlichen Stoffwechselsubstraten, was u.a. zu einer intrazellulären Laktatazidose, der Bildung von Proteasen, der Entstehung eines Zellödems und zu einer Akkumulation von Gallensalzen im Plasma führt (Martin et al. 1972, Kumamoto et al. 1999, Tanaka et

al. 2006). Die aus den Kupffer-Zellen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine erzeugen eine ausgedehnte Entzündungsreaktion, Cholangiohepatitis und Hyperbilirubinämie. Nach den durch die Ischämie reduzierten Stoffwechselprozesse kommt es während der Reperfusionsphase zu einer Exposition der Hepatozyten mit freien Radikalen und toxischen Stoffwechselmetaboliten. Diese Situation fördert die Entstehung von Hyperbilirubinämie und Cholestase.

Neben der Reperfusion hat die Hypothermie in einer Kaltlagerungsphase während der Organtransplantation Auswirkungen auf die Leberfunktion (Brass und Roberts 1995). Die massiven Temperaturunterschiede wirken sich ebenfalls nachteilig auf die Gewebequalität und den Stoffwechsel aus. Im speziellen Beispiel der Lebertransplantation müssen in der postoperativen Situation medikamentös induzierte Veränderungen der hepatobiliären Exkretion bedacht werden (Cisneros et al. 1991, Kamiike et al. 1988). So wirken beispielsweise Pharmaka wie Azithromycin, Cyclosporin A, Furosemid oder Phenobarbital inhibitorisch auf die Expression von Mrp2 (Jedlitschky et al. 2006). Die Exkretion von endogenen Substanzen, Bilirubinkonjugaten, Steroiden und Leukotrienen sowie die Absorption und Clearance von Medikamenten, z.B. von Antibiotika wie Ampicillin und Rifampicin, ist verzögert (Jedlitschky et al. 2006).

1.8.1.4 Bedeutung der Konservierungslösungen

Die verbesserte Konservierungstechnik hat einen großen Anteil an den erzielten Fortschritten bei Lebertransplantationen. Obwohl schon lange bekannt war, dass Hypothermie den ischämischen Zellschaden, bedingt durch Reduktion des Zellmetabolismus, vermindert, dauerte es viele Jahre, bis sich diese einfache Form der Organkonservierung durchsetzte (Sicular und Moore 1961). 1963 wurde in der Klinik die von Marchioro et al. beschriebenen in situ Abkühlung vor der Organentnahme praktiziert (Marchioro et al. 1963). Ab 1976 wurde die Euro-Collins-Lösung zur in situ Abkühlung der Leber zum Ende der Spenderhepatektomie und zur darauf folgenden Kaltlagerung angewendet. Mit dieser Lagerungsweise war es möglich, die sichere kalte Ischämiezeit auf 6-8 Stunden zu verlängern und Organe zwischen nahe gelegenen Städten auszutauschen. Trotzdem musste weiterhin mit der Empfängeroperation noch vor Eintreffen des Spenderorgans begonnen werden.

Der Eingriff musste gegebenenfalls bei Unbrauchbarkeit des Spenderorgans abgebrochen werden. Die Konservierungslösungen sollen in der ischämischen Phase die intra- und extrazelluläre Azidose vermindern, die Volumenverhältnisse der Hepatozyten aufrechterhalten und die Energiereserven auch unter anaeroben Bedingungen nutzbar machen. Weiterhin sollen alle Prozesse, die nicht für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen notwendig sind, reversibel gehemmt und die Integrität der Zellstrukturen konserviert werden.

Die 1988 zur Kaltlagerung der Organe eingeführte Belzer-University of Wisconsin (UW)-Lösung war ein entscheidender Schritt in der Entwicklung der Lebertransplantation (Belzer und Southard 1988). Dieses Lagerungsmedium verminderte den Konservierungsschaden bei einer sicheren Konservierungszeit von 24-30 Stunden in der tierexperimentellen und 20 Stunden in der humanen Anwendung (Jamieson et al. 1988a, Kalayoglu et al. 1988). Durch die Erkenntnisse der Pathophysiologie wurden, als wichtige Bestandteile dieses Konservierungsmediums, hochenergetische Phosphate zur Regeneration des ATP eingesetzt. Ziel war es, das Ausmaß der intrazellulären Azidose, das durch die Hypothermie verursachte Zellödem und die Menge der während der Reperfusionsphase frei werdenden Sauerstoffradikale zu vermindern. Durch den Einsatz von antioxidativen Substanzen wie Allopurinol und Glutathion sollte die Sauerstoffradikalbildung reduziert werden. Die UW-Lösung enthält keine Glucose, was die Bildung von Laktat und die nachfolgende Laktatazidose reduzieren soll. Das Laktobionat und die Raffinose verhindern die Entstehung eines Zellödems, wodurch die UW-Lösung vielen andern Lagerungsmedien überlegen ist (Yu et al. 1990). Insgesamt wird ein additiver Effekt für die Wirksamkeit aller Substanzen angenommen (Southard et al. 1990). Seit 1988 sind viele weiteren Modifizierungen der Standard-UW-Lösung getestet worden, die sich aber in der klinischen Routine nicht durchsetzen konnten (Badger et al. 1990, Mears et al. 1992). So wird die UW-Lösung noch immer als die Lösung der ersten Wahl betrachtet, aufgrund ihres hohen Handelspreises aber weiterhin an Alternativen geforscht. Seit Anfang der 60er Jahre bemühte sich Bretschneider um die Entwicklung einer kardioplegischen Lösung (Bretschneider 1980). Durch die Entdeckung der Pufferfunktion der Aminosäure Histidin entstand die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung, die anfangs während Operationen am offenen Herzen angewendet wurde. In den

darauffolgenden Jahren wurde die Konservierungslösung bei Herz- oder Nierentransplantationen eingesetzt. Für die Lebertransplantation kam die HTK-Lösung erstmalig 1988 bei einer ex-situ Operation zum Einsatz (Pichlmayr et al. 1988). Tierexperimentell konnte eine sichere Kaltkonservierungszeit von 22-24 Stunden gewährleistet werden (Lamesch et al. 1990). Nur wenige Zeit später war auch klinisch eine Kaltkonservierung von über 20 Stunden bei humanen Lebertransplantationen möglich (Gubernatis et al. 1991, Erhard et al. 1993). Neben dem Einsatz von Konservierungslösungen während der Organentnahme besteht auch die Möglichkeit, die Leber vor der Reperfusion freizuspülen (z.B. Carolina Rinse Lösung). Dieses Freispülen wird als "Rinse" bezeichnet und sollte eine optimierte Organfunktion ermöglichen (Takei et al. 1991). Wenige Jahre später konnte jedoch belegt werden, dass eine simultane Reperfusion der A. hepatica und der V. portae mit Blut auch der Perfusion mit Carolina Rinse Lösung überlegen ist (Post et al. 1995).

1.8.1.5 Bedeutung von Hämoglobin Glutamer-200 (HbG-200)

Hämoglobin Glutamer-200 ist ein durch chemische Vernetzung zwischen Hämoglobin und Glutaraldehyd hergestelltes Makromolekül. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete HbG-200 stammt vom Rind und hat eine mittlere Molekülmasse von 200.000 Dalton (HbG-200). Der Sauerstoffträger ("hemoglobin-based oxygen carrier", HBOC) Hämoglobin Glutamer wird in modifizierter Ringer-Laktat-Lösung aufgenommen, intravenös infundiert und dient der Behandlung von Anämie, Ischämie, Hämolyse, hämorrhagischem oder hypovolämischem Schock (European medicines agency 2012). Die Halbwertszeit von HbG-200 beträgt 30-40 Stunden (Topp et al. 2008). Da HBOC eine geringere Sauerstoffbindungskraft besitzt, ist die Sauerstoffbindungskurve nach rechts verschoben. Dieses Phänomen ist gleichbedeutend mit einer schnellen und erleichterten Sauerstoffabgabe. Durch den deutlicheren Haldane- und Bohr-Effekt ist sogar die Oxygenierung von azidotischem Gewebe erhöht. Bei kardiogenem Schock oder hohem Blutverlust kommt ein positiver Effekt auf das Blut des Splanchnikusgebietes zum Tragen, der eine geringere mikrozirkulatorische Dysfunktion bewirkt. Vermutlich erreichen die vernetzten Hämoglobinmoleküle, die mit einer geringen Viskosität im Plasma zirkulieren, innerhalb von wenigen Minuten doch noch Gebiete, die von den

Erythrozyten nicht mehr perfundiert werden können (European medicines agency 2012). Durch die gute Sauerstoffabgabe an geschädigte Zellen ist auch die poststenotische Gewebeoxygenierung optimiert. Insgesamt wird der histologische Schaden im Gewebe, bedingt durch Apoptose, verringert (Lanevski und Wardrop 2001). HbG-200 ist auch zur Anwendung in der Tiermedizin zugelassen und besitzt viele Vorteile, sowohl für das Tier als auch für den Tierarzt. Die Anwendung von HbG-200 ist sicher und effizient, da keine intensive Laboruntersuchung des Blutspenders erfolgen muss. Eine hämatogene Übertragung von Krankheiten wie FeLV, FIV, Hämoplasma und Bartonella, sowie Blutgruppenunverträglichkeiten müssen nicht befürchtet werden (Lanevski und Wardrop 2001). Das Präparat ist ungeöffnet bei Raumtemperatur bis zu drei Jahren haltbar. Durch diese Eigenschaft ist es schnell verfügbar und praktikabel in der Anwendung. Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass innerhalb von 24 Stunden post infusionem die Hälfte und nach 5-9 Tagen insgesamt 95 % des HbG-200 abgebaut ist. Das retikuloendotheliale System metabolisiert dabei 95 %, die Nieren weitere 5 % (Lanevski und Wardrop 2001).

1.8.1.6 Bedeutung von SnProtoporphyrin IX (“tin SnProtoporphyrin IX“, SnPP IX)

SnProtoporphyrin (SnPP) ist eine chemische Substanz aus der Gruppe der Porphyrine. Sie entsteht, wenn anstelle eines zweiwertigen Eisenions (Fe^{2+}) ein zweiwertiges Zinn (Sn^{2+}) in Protoporphyrin IX eingebaut wird, wie es beispielsweise verstärkt bei Eisenmangelanämie und auch bei Bleivergiftung der Fall ist. SnProtoporphyrin IX ist ein Metalloprotein mit Zinn als zentralem Atom, das v.a. in Leber, Milz und Niere vorgefunden wird. Es ist ein potenter synthetischer kompetitiver Inhibitor der Hämoxxygenase-1, die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Spaltung von Häm ist (Simionatto et al. 1984). Die Blockierung der HO-1 führt zu einer merkbaren und schnellen Exkretion von Häm in die Galle, was vermutlich dadurch verursacht wird, dass SnPP IX das Häm von seiner Bindung an der katalytischen Seite der HO-1 verdrängt. Das Häm wird also nicht zu Bilirubin metabolisiert, sondern unverändert mit der Galle in das Duodenum ausgeschieden, was eine Hyperbilirubinämie bei Mensch und Tier verhindert (Simionatto et al. 1984, Kappas et al. 1984). Es werden 25-30 % weniger endogenes Bilirubin in die Galle ausgeschieden als unter physiologischen Bedingungen. Trotz der geringeren

Ausscheidung kommt es nicht zu einer Gewebeakkumulation von unmetabolisiertem Häm. Die Reduktion des Abbaus von Häm zu dem potentiell neurotoxischen Bilirubin betrifft sowohl das endogene als auch experimentell zugefügtes exogenes Häm. Die durch SnPP IX verminderte Abgabe von Bilirubin in die Galle ist nicht assoziiert mit einer Änderung der Galleflussrate, des Gallevolumens oder mit der Ausscheidung von Gallesalzen (Simionatto et al. 1984). Eine Besonderheit ist, dass SnPP IX nicht nur ein potenter Inhibitor der HO-1 für das natürliche Substrat Häm ist, sondern gleichzeitig auch die Synthese von neuen HO-1 Enzymen in den Hepatozyten steigert. Diese neu gebildeten Enzyme werden ebenfalls vollständig in ihrer Funktion gehemmt (Sardana et al. 1986). In perfundierten Lebern verursacht die Blockierung der HO-1 eine Erhöhung des Portalvenenwiderstandes und eine Konstriktion der hepatozellulären Sinusoiden. Außerdem kommt es zu einer volumetrischen Reduktion des sinusoidalen Flusses. Der sinusoidale Widerstand steigt und die Flussgeschwindigkeit der roten Blutzellen sinkt. Das SnProtoporphyrin IX selbst wird schnell aus dem Plasma ausgeschieden und persistiert in den Geweben, in denen es die HO-1 schnell und anhaltend inhibiert. Es wird metabolisch unverändert über Urin und Fäzes ausgeschieden (Kappas et al. 1984, Simionatto et al. 1984).

1.8.1.7 Bedeutung der Kupffer-Zellen bei der Entstehung einer Cholestase

Die Kupffer-Zellen, auch "Macrophagocyti stellati" genannt, sind ortsständige Makrophagen mit lokaler Beweglichkeit. Sie gehören zum mononukleären phagozytotischen System (MPS), das auch als retikuloendotheliales System (RES) bezeichnet wird. Sie erfüllen die immunologische Funktion der Leber (Winwood und Arthur 1993). Kupffer-Zellen sind der Ort für die Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies. Dadurch haben sie eine große Bedeutung in der Pathophysiologie der verschiedenen Cholestaseformen, denn sowohl TNF α , IL1 β , IL6 und auch ROS sind als Mediatoren für die Herabregulation verschiedener hepatobiliärer Transporter bekannt (Bronfenmajer et al. 1966, Lumsden et al. 1988). Die Kupffer-Zellen bilden zusammen mit den Endothelzellen eine einschichtige Endothelwand und ergeben zusammen die größte Makrophagenpopulation im tierischen Organismus (Motta 1975, Mac Phee et al. 1992). Die Kupffer-Zellen sind reich an Organellen wie Phagosomen, Lysosomen

und Peroxisomen. Mithilfe ihrer Phagozytoseaktivität reinigen sie das Pfortaderblut und verhindern so den Zutritt von z.B. zirkulierenden Zellfragmenten, geschädigten Blutzellen und Bakterien sowie anderen gelösten Substanzen zum Leberparenchym (Mac Phee et al. 1992). Das erklärt auch ihre überwiegende Anordnung im periportal-afferenten Bereich der Lebersinusoide. Darüber hinaus sind die Kupffer-Zellen aktiv am Abbau des Hämoglobins aus den Erythrozyten beteiligt. Das dabei entstehende Bilirubin geben sie an die Hepatozyten ab (Bronfenmajer et al. 1966, Wake et al. 1990).

1.9 Allgemeine Einführung in die Fragestellung / Zielsetzung der Arbeit

Postoperative Cholestasen nach Lebertransplantationen können zu irreversiblen Leberschäden bis hin zur Notwendigkeit der Retransplantation führen. Bis zu einem Viertel aller lebertransplantierten Patienten entwickeln eine solche, schwere Cholestase, die zugleich die Mortalität 3 Monate post OP deutlich über die von nicht-cholestatischen Patienten steigen lässt (44 % vs. 20 %) (Fusai et al. 2006). Zur Entwicklung einer Cholestase tragen neben medikamentösen, toxischen und infektiösen Ursachen, Cholangitiden und insbesondere der durch Ischämie und Reperfusion ausgelöste Leberschaden bei. Erkenntnisse zu molekularen Mechanismen der Cholestase nach Ischämie und Reperfusion stammen vor allem aus tierexperimentellen Studien. Der Stand der Forschung ist auf dem Gebiet der warmen Ischämie und Reperfusion sehr viel weiter fortgeschritten als im Bereich der kalten Ischämie und Reperfusion. Nach kalter Ischämie und Reperfusion wurde bisher lediglich eine Kurzzeitregulation von Mrp2 durch Endozytose beschrieben (Ban et al. 2008). Es ist jedoch für Bsep, Ntcp und weitere hepatobiliäre Transporter eine Regulation nach kalter Ischämie und Reperfusion zu erwarten. Zukünftige pharmakologische Strategien zur Reduzierung des cholestatischen Leberschadens sollen darauf abzielen, die Expression hepatobiliärer Transporter wiederherzustellen und dadurch einer Retention von Gallensalzen entgegenzuwirken. Darüber hinaus scheint aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse die Modifikation der proinflammatorischen Kupferzellantwort ein wichtiges therapeutisches Ziel (Brass und Roberts 1995, Wanner et al. 1996).

Ziel der Arbeit war daher die Erarbeitung molekularer Cholestasemechanismen nach kalter Ischämie und Reperfusion der Leber sowie die Charakterisierung eines therapeutischen Ansatzes zur Reduktion der postoperativen Cholestase. Hierzu wurden die hepatobiliäre Expression, Regulation und Lokalisation von hepatobiliären Transportern in der Rattenleber nach kalter Ischämie und Reperfusion sowie der Einfluss der Induktion der HO-1 und deren Hemmung durch SnProtoporphyrin IX, als pharmakologische Präkonditionierungsverfahren, auf die Transporterexpression untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wie werden die hepatobiliären Transporter für Gallensalze und organische Anionen (Mrp2, Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2) im Modell der kalten Ischämie und Reperfusion in der Rattenleber reguliert?
2. Erfolgt eine lobulär zonierte Regulation?
3. Führt die Induktion der HO-1 mit Hämoglobin Glutamer-200 zu einer Verbesserung der hepatobiliären Transporterexpression?

2 Materialien

2.1 Geräte

Automatische Pipette, EDOS 5222	Eppendorf, Hamburg (D)
Blottingapparatur, semi dry transfer Horizontalapparat, Multiphor II	Pharmacia, Freiburg (D)
Blottingkammer, Fastblot B33 / B34	Biometra, Göttingen (D)
Elektrophoresekammer, Z37, 507-1	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Feinwaage, BP1200	Sartorius, Göttingen (D)
Filmentwickler, CURIX 60	AGFA, Köln (D)
Kodak, Image Station	Kodak, Stuttgart (D)
Kryotom, Leica CM 3050 S	Mikrom Laborgeräte, Walldorf (D)
LSM 510, Laserscanning-Mikroskop	Zeiss, Jena (D)
Magnetrührer, IkaMag® RCT	Ika Labortechnik, Staufen (D)
Minishaker, IKA®	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
pH-Meter, Inolab pH Level 1	WTW, Weilheim (D)
Photometer, GeneQuant II	Pharmacia, Karlsruhe (D)
Photometer, Ultrospec 2100 pro, UV/visible Spectrophotometer	Amersham Biosciences, Freiburg (D)
Scanner, Epson Perfection 4990 Foto	SEIKO Epson CORPORATION, Japan
Schüttler, KS 250 basic	Ika Labortechnik, Staufen (D)
Spannungsquelle, Electrophoresis Power Supply-EPS 600	Pharmacia Biotech, Karlsruhe (D)
Teflonhomogenisator, Thomaplast®-PTFE Homogenisator	Reichert Chemietechnik, Heidelberg (D)
Thermomixer, Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg (D)
Ultraschall-Homogenisator, Sonoplus HD	Bandelin, Berlin (D)
Ultrazentrifuge, Beckmann Coulter tl-100	Beckmann, Krefeld (D)
Zentrifuge, Centrifuge 5415 R,	Eppendorf, Hamburg (D)

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle eingesetzten aber nicht aufgeführten Substanzen, entsprachen der höchsten zu erwerbenden Reinheit.

Acrylamid 4K-Lösung (30 %) Mix 29:1	Applichem, Darmstadt (D)
Agarose	Biozym, Oldendorf (D)
Bio Rad Protein Assay	BIO RAD, München (D)
Bromphenol Blau	BIO RAD , München (D)
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe (D)
Complete Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Tabletten)	Roche, Mannheim (D)
ECL Western Blotting Detektionssystem	Perkin Elmer Lifesciences, Boston (USA)
Filterpapier	Whatman, Maidstone (GB)
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Carpinteria (USA)
Hyperfilm	Amersham, Freiburg (D)
Non-Fat Dry Milk	BIO RAD , München (D)
Objektträger	Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde (D)
Precision Plus Protein Standards Dual Color	BIO RAD , München (D)
Ponceau S	Serva, Heidelberg (D)
Protran® Nitrozellulose Membran	Schleicher&Schuell, Bioscience, Dassel (D)
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare, Amersham Hybond-P, Buckinghamshire (GB)
Re-Blot Plus, Strong Antibody Stripping Solution	Chemikon (USA)
Tissue Tek	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude (NL)

2.3 Lösungen und Puffer

Belzer's University of Wisconsin (UW)-Lösung	Reagenz	Konzentration
pH 7,4 Osmolarität 320 mOsm/kg Natrium 29 mmol/l Kalium 125 mmol/l	Laktobionat	100 mM
	Raffinose	30 mM
	K-H ₂ PO ₄ /K-HPO ₄ ⁻	25 mM
	Mg-Sulfat	5 mM
	Glutathion	3 mM
	Adenosin	5 mM
	Allopurinol	1 mM
	HAES	50 g/l

Blockierungs-Lösung

3-5% (w/v) BSA oder Milchpulver in TBST

Blotting-Puffer	Anode I	Anode II	Kathode
Tris	0,3 M	0,025 M	
Methanol	20 %	20 %	20 %
M Aminohexansäure			0,04 M

Elektrophorese-Puffer	Reagenz	Konzentration
	Tris	25 mM
	SDS	4 mM
	Glycin	250 mM

HN-Puffer	Reagenz	Konzentration
	Tris / HCl pH 7,6	10 mM
	Sucrose	250 mM

Krebs-Henseleit-Lösung	Reagenz	Konzentration
	NaCl	113 mM
	KCl	4,8 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM
	NaHCO ₃	25 mM
	CaCl ₂	2,5 mM
	Glucose	5,7 mM

RL-Lysis-Puffer	Reagenz	Konzentration
	Tris / HCL pH 7,4	20 mM
	NaCl	140 mM
	NaF	10 mM
	Natriumpyrophosphat x 10 H ₂ O	10 mM
	Triton X-100	1 %
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Natriumorthovanadat	1 mM
	β-Glycerophosphat	20 mM

2 x SDS-Auftragungspuffer	Reagenz	Konzentration
	Tris / HCl pH 6,8	220 mM
	SDS	9 %
	Glyzerin	40 %
	Bromphenolblau	0,125 %
	DTT	1M

TBS-T	Reagenz	Konzentration
	Tris / HCl pH 7,4	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1 %

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Antikörper		Referenz	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Immunoblot
α - β -Aktin	Monoklonaler AK gegen β -Aktin (Maus)	Abcam, Cambridge (UK)		1:5000
EAG 15	Polyklonaler AK gegen Mrp2 (Kaninchen)	Dr. Keitel, Düsseldorf (D)	1:200	1:2000
EAG 15.4	Polyklonaler AK gegen Mrp2 (Kaninchen)	Prof. Keppler, Heidelberg (D)	1:200	1:2000
α -ED 2	Polyklonaler AK (CD 163) gegen Kupffer Zellen (Maus)	Serotec, Oxford (UK)	1:50	
α -HO-1	Polyklonaler AK gegen HO-1 (Kaninchen)	Stressgen Biotechnologies, Yorkshire (UK)	1:200	1:2000
K4	Polyklonaler AK gegen Ntcp (Kaninchen)	Prof. Stieger, Zürich (CH)	1:200	1:1000
K10	Polyklonaler AK gegen Oatp1a1 (Kaninchen)	Prof. Stieger, Zürich (CH)	1:200	1:1000
K15	Polyklonaler AK gegen Oatp1b2 (Kaninchen)	Prof. Stieger, Zürich (CH)	1:200	1:1000
K22	Polyklonaler AK gegen Oatp1a4	Prof. Stieger, Zürich (CH)	1:200	1:1000

	(Kaninchen)			
K44	Polyklonaler AK gegen Bsep (Kaninchen)	Prof. Stieger, Zürich (CH)	1:200	1:5000
M ₂ III ₆	Monoklonaler AK gegen Mrp2 (Maus)	Alexis Biochemicals (USA)	1:25	1:50
α- Glutamin- Synthetase	Monoklonaler AK gegen Glutamin- synthetase (Maus)	BD Biosciences (USA)	1:200	
α- Glutamin- Synthetase	Polyklonaler AK gegen Glutamin- Synthetase (Maus)	Sigma Aldrich (USA)	1:200	
α-ZO-1	Polyklonaler AK gegen ZO-1 (Kaninchen)	Invitrogen (Germany)	1:300	

2.4.2 Sekundärantikörper

Antikörper		Referenz	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Immunoblot
goat-Cy3- α -guinea pig	Cy3-gekoppelter anti- Meerschwein- chen AK	Dianova, Hamburg (D)	1:250	
goat-Cy3- α -rabbit	Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen AK	Dianova, Hamburg (D)	1:500	
goat-Cy2- α -mouse	Cy2-gekoppelter anti-Maus AK	Dianova, Hamburg (D)	1:100	
goat-Cy2- α -rabbit	Cy2-gekoppelter anti-Kaninchen AK	Dianova, Hamburg (D)	1:100	
HRP- conjugated -sheep- α - mouse	polyklonales Meerrettich- Peroxidase gekoppeltes anti- Maus IgG	Dako (USA)		1:7500
HRP- conjugated -donkey- α - rabbit	polyklonales Meerrettich- Peroxidase gekoppeltes anti- Kaninchen IgG	Dako (USA)		1:7500

3 Methoden

3.1 Tierversuche

Die tierexperimentellen Versuche wurden von Herrn PD Dr. Stefan Topp, Arne Macher und Anne Linderer, Klinik für Allgemein-, Viszeral und Kinderchirurgie, durchgeführt. Die Darstellung des tierexperimentellen Versuchsaufbaus wird daher im Folgenden nur gekürzt dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Tierexperimente findet sich in den Dissertationsschriften von Arne Macher und Anne Linderer.

3.1.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Versuche fanden unter Aufsicht der Versuchsleitung in der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, gemäß des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313) statt. Das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Fachbereich Tierschutz, Leibnitzstraße 10, 45659 Recklinghausen) erteilte am 22.05.2007 die Genehmigung zur Durchführung dieser Versuche (Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.038).

3.1.2 Versuchstiere und Haltung

Für die Tierversuche wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 200-240 g eingesetzt. Alle Tiere wurden in einem temperaturkontrollierten Raum (21-23°C) mit gleich bleibendem Tag-Nacht-Rhythmus (Licht von 6:00h-18:00h) und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Die Behandlung erfolgte entsprechend den Kriterien der Leitlinie "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication, 86-23,1985).

3.1.3 Versuchsgruppen

Für die Experimente zur Charakterisierung der Regulation hepatobiliärer Transporter nach kalter Ischämie und Reperfusion sowie eines möglichen therapeutischen Effekts der Induktion von HO-1 wurden vier Gruppen mit jeweils 4-6 Tieren gebildet. Die Untersuchungen erfolgten an Lebergewebe nach 44 Stunden Ischämie und 3 Stunden Reperfusion unter Verwendung des isoliert perfundierten Rattenlebermodells, "Isolated Perfused Rat Liver" (IPRL) (Gruppe B-D) und an unbehandeltem Lebergewebe (Kontrollgruppe) (Gruppe A). Die Präinduktion der HO-1 erfolgte in Gruppe C und D 12 Stunden vor Hepatektomie durch intravenöse Applikation von HbG-200. In Gruppe D wurde 60 Minuten vor Organentnahme die HO-1 Aktivität durch intraperitoneale Applikation von Zinn-Protoporphyrin (SnPP IX) blockiert.

1. Gruppe A: Kontrollgruppe, unbehandeltes Lebergewebe, ohne Ischämie und Reperfusion, 5 min Perfusion mit 0,9 % NaCl
2. Gruppe B: kalte Ischämie (4°C) für 44 h, Reperfusion für 3 h
3. Gruppe C: Präkonditionierung mit HbG-200 12 h vor Hepatektomie, kalte Ischämie (4°C) für 44 h, Reperfusion für 3 h
4. Gruppe D: Präkonditionierung mit HbG-200, SnPP IX intraperitoneal 1 h vor Hepatektomie und kalte Ischämie (4°C) für 44 h, Reperfusion für 3 h
5. Gruppe E: Kontrollgruppe, HbG-200 59 h vor Hepatektomie, ohne Ischämie und Reperfusion, 5 min Perfusion mit 0,9 % NaCl
6. Gruppe F: Kontrollgruppe, SnPP IX 48 h vor Hepatektomie, ohne Ischämie und Reperfusion, 5 min Perfusion mit 0,9 % NaCl

3.1.4 Präinduktion der Hämoxygenase-1 mittels Hämoglobin Glutamer-200

Die Präkonditionierung der Versuchstiere in Gruppe C und D erfolgte 12 Stunden vor Durchführung der Hepatektomie. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Thiopental (80 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Für die intravenöse Infusion von HbG-200 wurde ein zentraler Venenkatheter in die rechte V. jugularis

eingesetzt. Nach der Bestimmung des Körpergewichtes der Tiere wurde das Blutvolumen einer jeden Ratte ermittelt, wie zuvor bei Lee et al. (1985) beschrieben. HbG-200 wurde gewichtsadaptiert infundiert, um eine definierte Konzentration von 3,9 g/dl HbG-200 post infusionem zu erreichen. Um eine Kreislaufüberlastung durch HbG-200 zu vermeiden, erfolgte die zentralvenöse Infusion entsprechend den Herstellerangaben mit einer maximalen Infusionsrate von 10 ml/kg/h (Topp et al. 2008).

3.1.5 Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Für die in vitro Reperfusion der kalt konservierten Rattenlebern wurde das IPRL-Modell genutzt. Die Hepatektomie wurde bei Wistar Ratten unter Allgemeinanästhesie mit Isofluran durchgeführt. Der Gallengang wurde mit einem Polyethylenschlauch kanüliert. Vor der Organentnahme wurden die Lebern in situ durch die Portalvene mit einem konstanten Druck von 15 ml Wassersäule mit 15 ml eiskalter NaCl-Lösung perfundiert, unmittelbar gefolgt von 30 ml University of Wisconsin (UW) Lösung. Nach Hepatektomie wurden zwei 12 G Teflon Katheter in die V. cava cranialis und caudalis eingesetzt. Die Lebern wurden für 44 Stunden bei 4°C in UW Lösung gelagert. Die Organreperfusion erfolgte für 180 Minuten im IPRL mit einem bluthaltigen Perfusat. Die Apparatur entsprach der von Miller et al. (1951) mit Modifikationen wie zuvor beschrieben (Upadhya et al. 2003). Das Perfusat bestand aus Wistar Rattenblut versetzt mit Krebs-Henseleit (KH) Lösung und war mit 0,2 % BSA und 0,1 g Dextrose supplementiert. Der Hämatokrit des Perfusates betrug 14 %. Natriumtaurocholat (10 µmol/h) und Heparin (1.000 U/h) wurden kontinuierlich in das System eingefügt. Die Lebern wurden bei 37°C in KH Lösung gehalten und druckkonstant mit 15 cm Wassersäule perfundiert. Der pO₂ wurde über 400 mm Hg gehalten und durch wiederholtes Hinzufügen von 8,4 % igem Bikarbonat ein pH von 7,4 eingestellt. Die Oxygenierung des Perfusates erfolgte durch 95 % O₂ und 5 % CO₂. Das Zirkulationsvolumen dieses geschlossenen Systems wurde konstant bei 100 ml gehalten. Nach abgeschlossener Reperfusionsphase wurden die Organe für histopathologische, klinisch-chemische, zell- und molekularbiologische

Untersuchungen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.6 Präkonditionierung von Kontrolltieren mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX

Zum Ausschluss möglicher Effekte auf die hepatobiliäre Transporterexpression wurden Kontrolltiere 59 Stunden vor Hepatektomie mit Hämoglobin Glutamer-200 und 48 Stunden vor Hepatektomie mit SnProtoporphyrin IX präkonditioniert. Beide Kontrollgruppen durchliefen keine Phase der Ischämie und Reperfusion.

3.2 Histologische Methoden

3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanningmikroskopie

Die indirekte Immunfluoreszenz dient der visuellen Darstellung und Lokalisation von Proteinen. Im Zwei-Schicht-Verfahren wird zunächst ein spezifischer Primärantikörper auf die Gewebeproben aufgetragen, der in einem zweiten Schritt mit an Enzym gekoppeltem Sekundärantikörper reagiert. Durch die Enzym-Substrat-Reaktion wird ein Farbstoff generiert, der bei der Laserscanningmikroskopie die Darstellung der gesuchten Proteine ermöglicht.

3.2.1.1 Anfertigung der Kryoschnitte

Die Rattenlebern wurden bei -80°C gelagert und zum Transport in flüssigem Stickstoff überführt. Mit dem Kryotom (CM 3050 S, Leica) wurden Schnitt mit einer Gewebedicke von je $6\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Kammertemperatur war auf -19°C und die Objektträgertischtemperatur auf -16°C eingestellt. Vor der endgültigen Lagerung bei -20°C wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern für 60 min bei RT getrocknet. Zur quantitativen Vergleichbarkeit

der Proben wurden Gewebeschnitte, die mittels quantitativer Immunfluoreszenz verglichen wurden, immer auf denselben Objektträger aufgebracht.

3.2.1.2 Immunhistologische Färbung

Die Kryoschnitte wurden zunächst in -20°C kaltem Methanol für 5 Minuten fixiert. Danach wurden die Organschnitte zunächst 1x20 sec und danach 2x10 min in 1xPBS gewaschen. Zur Blockierung der unspezifischen Proteinbindungen wurden sie für 30 min in 1xPBS, supplementiert mit 5% FCS, inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers (in 1xPBS mit 5 % FCS) erfolgte in einer Feuchtkammer für 6-8 h bei RT. Die Feuchtkammer bestand aus einer lichtundurchlässigen Kunststoffschale, deren Boden mit PBS getränktem Whatman-Papier ausgelegt war. Zur Entfernung des Antiserums folgte 3x10 min Waschen in 1xPBS. Der Sekundärantikörper (in 1xPBS mit 5 % FCS) wurde für 60 min bei RT inkubiert und durch zwei Waschschrte je 10 min in 1xPBS entfernt. Abschließend wurden die Objektträger für eine Minute in Aqua dest. geschwenkt und die Kryoschnitte mit "Mounting Medium" und Deckgläschen versehen. Bis zur vollständigen Trocknung wurden die Präparate für 24 h bei 4°C horizontal gelagert. Die weitere Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

3.2.1.3 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Es wurden nur Proben, die gemeinsam auf einen Objektträger aufgezogen waren, miteinander unter identischen Bedingungen verglichen (Objektiv, Pinhole, Formatgröße, Zoom, Filtereinstellungen und Scan-Modus). Die Leberschnitte wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 510, Zeiss, Software Version 3.2 SP 2) analysiert. Zur Detektion der Cy3- und FITC markierten Zweitantikörper wurden der Argon-Krypton und der Helium-Neon Laser verwendet. Die Detektion erfolgte bei Anregung mit 488 nm für FITC und bei 543 nm für Cy3. Bei Co-Lokalisation von grüner (FITC) und roter (Cy3) Fluoreszenz wurde ein gelbes Signal detektiert.

3.2.1.4 Densitometrische Auswertung

Es wurden Übersichtsaufnahmen von einem Objektträger mit jeweils $n=4$ pro Tiergruppe (20er Objektiv) mit periportal und perivenöser Zone eines Lobulus aufgenommen. Mit einem $12\text{ }\mu\text{m}$ langen Cursor, der im rechten Winkel über die Membranfluoreszenz gelegt wurde, konnte nun die maximale Intensität des Signals quantifiziert werden. Die Datenerhebung erfolgte an jeweils zehn unterschiedlichen repräsentativen Membranen, in einem Radius von $40\text{ }\mu\text{m}$ von der Zentralvene bzw. des Periportalfeldes. Das zytoplasmatische Hintergrundsignal wurde vom Maximalwert der Membran subtrahiert und die Daten in eine Microsoft-Excel-Tabelle übertragen. Aus diesen zehn Werten pro periportalem- bzw. perivenösem Feld wurde der Mittelwert je Zone und Tier errechnet. Als Referenzwert diente die mittlere densitometrische Signalstärke der perivenösen Zone der Kontrollgruppe. Es wurden die perivenösen Messwerte der Kontrollen und auch die densitometrischen Messungen der übrigen Versuchsgruppen statistisch auf den Referenzwert bezogen. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurde die Signifikanz berechnet und $p<0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Isolierung der Gesamtmembranfraktion aus Lebergewebe

Von jedem Tier wurde im Kryostat ein Lebergewebe von ca. $0,5 \times 0,5\text{ cm}$ Kantenlänge aliquotiert und dabei auf ein möglichst einheitliches Probengewicht geachtet. Zum Auftauen wurden die Leberproben mit $0,75\text{ ml}$ eisgekühltem HN-Puffer (mit Complete Protease Inhibitor) versetzt und mit einem Teflon-Homogenisator, auf Eis, bei 500 rpm zerkleinert und homogenisiert. Die Homogenate wurden in spezielle Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt und das Gewicht mit Hilfe der Feinwaage unter Zusatz von HN-Puffer auf hundertstel g genau ausgewogen. Durch anschließende Ultrazentrifugation bei 100.000 g (55000 U/min) und 4°C für 60 min erfolgte die Trennung der Gesamtmembranfraktion. Der Überstand mit der zytosolischen Fraktion wurde vollständig abpipettiert und gesondert eingefroren. Das Pellet wurde mit 1 ml eisgekühltem RL-Puffer (mit Complete Protease Inhibitor)

versetzt, mit einer Pipettenspitze zerkleinert und durch langsames Auf- und Abpipettieren solubilisiert. Nach der Umfüllung in 2 ml Eppendorfgefäße wurden die Proben für 10 sek mit einem Ultraschallhomogenisator behandelt ("low", 65), danach für 10 sec auf Eis gestellt und der Vorgang insgesamt vier bis fünfmal wiederholt. Abschließend wurden die Proben für 2 min und 4°C bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mit dem "BioRad-Protein Assay" nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). In diesem Verfahren bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 an basische Aminosäurereste von Proteinen und verschiebt dadurch sein Absorptionsmaximum von 465 nm (rot) auf 595 nm (blau). Die Bindung des Farbstoffes erfolgt innerhalb von 2 Minuten und der Protein-Farbstoffkomplex bleibt für ca. eine Stunde löslich. Für die Messung wurde eine Bradford-Lösung, bestehend aus 1/5 Anteilen Bradfordreagenz (Bio Rad Protein Assay) und 4/5 Anteilen Aqua dest. hergestellt. In einem dreifachen Ansatz wurden jeweils 5 µl (bzw. 5 µl der 1:10 in RL-Puffer vorverdünnten Probe) und 995 µl Bradfordlösung in einer Einwegküvette gemischt. Für die Bestimmung des Nullwertes wurden anstelle der Probe 5 µl RL-Puffer hinzugegeben. Die am Photometer gemessene Extinktion bei $\lambda=595$ nm wurde mit einem gerätespezifischem Eichfaktor multipliziert und so die Proteinmenge in µg/µl berechnet.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Lysate wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration mit 2 µg/µl verdünnt. Es wurden 40 µg Protein eingesetzt und die Proben zusammen mit 20 µl 2xSDS Ladungspuffer für 30 min bei 37°C denaturiert. Auf einer vertikalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese) werden die Proteine elektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt (Laemmli 1970). Das Gel besteht aus zwei verschiedenen

übereinanderliegenden Gelsystemen - dem Sammelgel und dem Trenngel - die sich durch Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Die Polymerisation von Acrylamid (PAA) wird mit Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert wobei eine Gelmatrix entsteht. Dabei sind die Porengröße und somit auch die Auftrennungseigenschaften des Gels von der Acrylamidkonzentration abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurden 7,5 %-ige, 10 %-ige, 12 %-ige oder 15 %-ige Polyacrylamid-Trenngele verwendet. Das Sammelgel entstand aus einer 5 %-igen Polyacrylamidlösung. Nach einer Einlaufphase in das Sammelgel mit 120 V wurde die Voltzahl, nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, auf 180 V erhöht.

Um das relative Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurden Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht parallel zu den Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für einen Western-Blot verwendet.

Gel (10 ml)	Reagenz	Volumen
Polyacrylamid-Sammelgel (5 %)	dH ₂ O	6,8 ml
	30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	1,7 ml
	1 M Tris / HCl pH 6,8	1,25 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	10 µl
Polyacrylamid-Trenngel (7,5 %)	dH ₂ O	4,8 ml
	30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	2,5 ml
	1,5 M Tris / HCl pH 8,8	2,5 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	8 µl
Polyacrylamid-Trenngel (10 %)	dH ₂ O	4,0 ml
	30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	3,3 ml
	1,5 M Tris / HCl pH 8,8	2,5 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	4 µl

Polyacrylamid-Trenngel (12 %)	dH ₂ O	3,3 ml
	30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	4,0 ml
	1,5 M Tris / HCl pH 8,8	2,5 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	4 µl
Polyacrylamid-Trenngel (15 %)	dH ₂ O	2,3 ml
	30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	5,0 ml
	1,5 M Tris / HCl pH 8,8	2,5 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	4 µl

3.3.4 Immunoblot Analyse (Western Blot)

Beim Western Blot erfolgt der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran. Da dabei sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten bleiben, können sie spezifisch über Antikörper nachgewiesen werden.

3.3.4.1 Proteintransfer

Die vorliegende Arbeit nutzte die sogenannte "semi-dry-Methode" mit einer Proteinübertragung auf PVDF-Membranen. In einer Blottingkammer wurden zunächst fünf in Anode I-Puffer getränkte Filterpapiere auf die Anodenplatte gelegt und darauf 3 mit Anode II-Puffer befeuchtete Filterpapiere. Die Membran wurde nach einer Aktivierung mit Methanol ebenfalls mit Anode II-Puffer benetzt. Das Gel wurde mit Kathoden-Puffer befeuchtet und auf die Membran gelegt. Der Abschluss wurde

durch fünf mit Kathoden-Puffer getränkte Filterpapiere und die Kathodenplatte gebildet. Es wurde auf ein möglichst bündiges und luftblasenfreies Übereinanderschichten der einzelnen Komponenten geachtet und die Kathodenplatte mit Bleigewichten beschwert. Mit einer Stromstärke von 1mA pro cm²x0,8 erfolgte der Proteintransfer in einem Zeitraum von 2-2,5 h von dem Gel auf die Membran. Nach Ende des Transfers wurde die Membran für 2x5 min in TBS-T gewaschen, um Methanolreste zu entfernen. Zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen wurde die Membran für 1 h in Blockingpuffer (mit 5 % BSA in TBS-T) inkubiert. Der spezifische Proteinnachweis erfolgte mit einem Antikörper, der gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtet war. Dazu wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper (mit 3 % BSA in TBS-T) inkubiert. Vor der Auftragung des Sekundärantiköpers folgten 3 Waschschrte in TBS-T-Puffer. Danach wurde der Zweitantikörper für 1 h bei RT (mit 3 % BSA in TBS-T) inkubiert und es folgten drei Waschschrte in TBS-T-Puffer von jeweils 20 min. Abschließend wurde die Membran für 1-2 min mit ECL-Reagenz benetzt.

3.3.4.2 Das Reaktionsprinzip der Chemolumineszenz

Die Detektion des mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers dient als eine nicht-radioaktive Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen. Durch die Reduktion von H₂O₂ und Oxidation von Luminol wird eine Lichtemission erzeugt, die Chemilumineszenz. Durch Lichtemission (428 nm) kommt es zur Belichtung des Röntgenfilms, der anschließend entwickelt und fixiert wird.

3.3.4.3 Densitometrische Auswertung

Mit Hilfe des Programms "Molekular Imaging Software" (Version 4.0.5, Kodak) wurde die Quantifizierung der Signalstärke der spezifischen Banden vorgenommen. Jeweils vier Tiere einer Gruppe wurden in die Auswertung einbezogen. Die Bandenstärke wurde mit der Expression von β -Aktin als Beladungskontrolle normalisiert. Die mittlere Signalstärke der Banden des Kontrollkollektives diente als Referenzwert. Alle weiteren Berechnungen der anderen Tiergruppen wurden auf diesen Referenzwert bezogen. Die Signifikanz wurde durch die Anwendung des Mann-Whitney-Tests geprüft und bei $p < 0,05$ als signifikanter Unterschied bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Durch indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde die subzelluläre, zelluläre und lobuläre Lokalisation der Transporter Mrp2, Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 dargestellt. Darüber hinaus wurden die Hämoxxygenase-1 und Kupffer-Zellen lokalisiert. Dazu wurden die Kryoschnitte von den Leberproben mit entsprechenden Antiseren inkubiert (EAG 15.4., K44, K4, K10, K15, K22, α -Hämoxxygenase-1, α -ED2) und mit Cy2 bzw. Cy3 gekoppeltem Anti IgG detektiert. Um die zonale Verteilung der untersuchten Antigene darstellen zu können, wurde Glutaminsynthetase als Markerprotein für perizentrale Hepatozyten eingesetzt. Zur besseren Darstellung der subapikalen, intrazellulären Mrp2- und Bsep-positiven Vesikel, wurden diese Membrantransporter zusätzlich zusammen mit einem Antikörper gegen "tight junctions" (α -ZO-1) dargestellt.

4.1.1 Expression von hepatobiliären Transportern bei Kontrolltieren

Um die prozentuale Zu- oder Abnahme der perivenösen und periportalen Membranexpression darstellen zu können, wurde zunächst die Membransignalintensität bei unbehandelten Kontrolltieren ermittelt. Die Membranexpression der perivenösen Hepatozyten wurde bei allen untersuchten Transporterproteinen mit 100 % gleichgesetzt. Mrp2 zeigte eine periportale Membranintensität von $100,1 \pm 1,4$ % (nicht signifikant, Abb. 5). Bei Bsep lag das Membransignal bei $99,4 \pm 1,4$ % (nicht signifikant, Abb. 8). Ntcp wies in den Kontrollgruppen eine periportale Signalstärke von $101,9 \pm 10$ % und Oatp1a1 von $102,4 \pm 2,6$ % auf (nicht signifikant, Abb. 11, Abb. 13). Oatp1a4 sowie auch Oatp1b2 werden heterogen über den Leberlobulus exprimiert und zeigten deshalb periportal signifikant geringere Membransignale im Vergleich zu den perivenösen Hepatozyten.

In periportalen Hepatozyten hatte Oatp1a4 eine Membransignalintensität von $62,4 \pm 1,6 \%$ ($p < 0,001$ vs. perizentrale Hepatozyten, Abb. 15) und Oatp1b2 von $57,25 \pm 10 \%$ ($p < 0,001$, Abb. 18). Zusätzlich wurde das Membransignal von Oatp1a4 in den Glutaminsynthetase-positiven Zellen, direkt um die Zentralvene herum, ermittelt ($45,97 \pm 6,26 \%$ $p < 0,001$ vs. perivenöse Hepatozyten, Abb. 16).

4.1.2 Zonierte Regulation von hepatobiliären Transportern nach kalter Ischämie und Reperfusion

Nach 44 Stunden kalter Ischämie und Reperfusion zeigte die Densitometrie von Mrp2 in den perizentralen Hepatozyten eine Reduktion der Membranintensität auf $79,0 \pm 2,6 \%$ der Kontrollen ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 6). Die Membransignale waren reduziert, verbreitert, unscharf begrenzt und teilweise unterbrochen. Im Zytoplasma zeigten sich immunoreaktive Vesikel. Die Membranexpression im Periportalfeld blieb unverändert, aber auch hier konnten subapikale intrazelluläre Transporter-positive Vesikel dargestellt werden (Abb. 5, Abb. 7). Bei Bsep war das Membransignal in den perizentralen Hepatozyten auf $80,6 \pm 8,4 \%$ herabreguliert ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 9). Wie bei Mrp2 war die Immunfluoreszenz von Bsep strukturell verändert und es fanden sich immunoreaktive Vesikel im subapikalen Kompartiment. Im Bereich des Portalfeldes zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Membransignale, aber ebenfalls intrazelluläre immunoreaktive Vesikel (Abb. 8, Abb. 10). Das perivenöse Membransignal von Ntcp war nach kalter Ischämie und Reperfusion in perivenösen Hepatozyten auf $65,8 \pm 5,0 \%$ herabreguliert ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 12). Die Membranen waren deutlich verbreitert und zeigten submembranös gelegene Ntcp-positive Vesikel. In periportalen Hepatozyten war auch bei Ntcp keine signifikante Veränderung des Membransignals nachweisbar (Abb. 11). Bei Oatp1a1 wurde in perizentralen Hepatozyten keine signifikante Veränderung der Membranintensität im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet ($94,8 \pm 3,2 \%$, nicht signifikant, Abb. 14). Die Membransignale waren verbreitert und unscharf begrenzt. Im Zytoplasma der Hepatozyten waren vermehrt immunoreaktive vesikuläre Strukturen darstellbar. In den periportalen Hepatozyten zeigte sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der

Signalintensität ($96,4 \pm 2,8 \%$, nicht signifikant, Abb. 13). Wie auch bei Oatp1a1 war das Membransignal von Oatp1a4 im perivenösen Hepatozyten nicht signifikant ($96,9 \pm 8,0 \%$) verändert (Abb. 15, Abb. 17). Signifikante Fluoreszenzveränderungen, eine niedrige Expression von Oatp1a4 mit $45,2 \pm 5,56 \%$, zeigten sich aber weiterhin in den Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten direkt um die Zentralvene herum ($p < 0,001$, Abb. 16, Abb. 17). Oatp1b2 zeigte in den perizentralen Hepatozyten eine zu den Kontrollen unveränderte Transporterexpression von annähernd 100% ($100,2 \pm 3,0 \%$, nicht signifikant, Abb. 19). Die immunoreaktiven Strukturen ähnelten sowohl bei Oatp1a4 als auch bei Oatp1b2 dem Bild von Oatp1a1. Die Zellmembranen waren verbreitert und im Zytoplasma stellten sich immunoreaktive Vesikel dar (Abb. 18). Aufgrund der primären Zonierung von Oatp1a4 zeigte sich ein periportales Membransignal von $56 \pm 2,2 \%$ ($p < 0,05$ vs. perivenöse Kontrolle, Abb. 17), auch bei Oatp1b2 konnte aufgrund seiner geringeren Expression im Bereich der Portalfelder Werte von $49,6 \pm 7,2 \%$ ermittelt werden, die aber nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrolltieren waren ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 19). Durch die Co-Färbung mit "tight junctions" konnten die vor allem in den perizentralen Hepatozyten zunehmenden subapikalen, intrazellulären Mrp2- und Bsep-positiven Vesikel dargestellt werden (Abb. 7, Abb. 10).

4.1.3 Effekt der Induktion der Hämoxxygenase-1 auf die Lokalisation hepatobiliärer Transporter

Nach Induktion der HO-1 und nachfolgender Ischämie und Reperfusion lag die Membranintensität von Mrp2 in perizentralen Hepatozyten bei $92,6 \pm 6,5 \%$ und war damit nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen (Abb. 6). Das Membransignal perizentraler Hepatozyten war homogener als nach Ischämie und Reperfusion. Die qualitative Analyse der Immunfluoreszenz ergab weniger intrazelluläre Vesikel. Insgesamt war das optische Bild des Membransignals fast vollständig erhalten und den Kontrolltieren gleichend (Abb. 5, Abb. 7). Ebenfalls war das perivenöse Membransignal von Bsep homogener als in der Gruppe nach Ischämie und Reperfusion (Abb. 8, Abb. 10). Die Membranintensität der perizentralen Hepatozyten war nicht signifikant

unterschiedlich zu den Kontrollen ($95,8 \pm 5,2$ %, Abb. 9). In periportalen Hepatozyten waren weiterhin intrazelluläre Mrp2- und Bsep-positive Vesikel darstellbar (Abb. 7, Abb. 10). Die Transporterexpression von Ntcp wurde durch die Induktion der HO-1 nicht beeinflusst. Die Membranintensität der perivenösen Hepatozyten blieb weiterhin signifikant reduziert und betrug $64,9 \pm 4,3$ % ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 12). Im Bereich der V. centralis war das Membransignal optisch mit dem der unbehandelten Tiere nach Ischämie und Reperfusion vergleichbar (Abb. 11). Periportal konnten keine Veränderungen der Ntcp-Immunfluoreszenz festgestellt werden ($113,8 \pm 3,6$ %, nicht signifikant, Abb. 12). Die Transporter der Oatp-Familie zeigten ebenfalls nach der Präkonditionierung mit HbG-200 keine Veränderung der Membranintensität. Oatp1a1 hatte in perivenösen Hepatozyten weiterhin eine Signalintensität von $97,0 \pm 3,4$ % (nicht signifikant, Abb. 14), Oatp1a4 zeigte in den perivenösen, Glutaminsynthetase-negativen Hepatozyten, eine Signalintensität von $95,3 \pm 6,0$ % (nicht signifikant, Abb. 17) und in den Glutaminsynthetase-positiven Zellen von $38,18 \pm 5,16$ % (nicht signifikant vs. Kontrolle, Abb. 17). Oatp1b2 hatte im Bereich der V. centralis eine Membranintensität von $100,9 \pm 1,3$ % (nicht signifikant, Abb. 19). Alle drei Transporter zeigten weiterhin verbreiterte Membransignale (Abb. 13, Abb. 15, Abb. 16, Abb. 18).

4.1.4 Effekt der pharmakologischen Hemmung der Hämoxygenase-1 mit SnProtoporphyrin IX auf die Lokalisation hepatobiliärer Transporter

Die durch SnPP IX bedingte pharmakologische Hemmung der HO-1 führte in perivenösen Hepatozyten nach Ischämie und Reperfusion zu einer reduzierten Signalintensität von Mrp2 ($69,1 \pm 6,4$ %, $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 6). In Hepatozyten der Zone 3 zeigten sich wieder Ausziehungen der Hepatozytenmembranen und subkanalikuläre Vesikel (Abb. 5). Sowohl die Membransignale als auch das optische Bild von Bsep glich nach Vorbehandlung mit SnPP IX denen der unbehandelten Lebern nach Ischämie und Reperfusion (Abb. 8). Die densitometrische Auswertung der Bsep

Membransignale ergab eine Abnahme des Membransignals in perivenösen Hepatozyten auf $66,1 \pm 6,0 \%$ ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 9). Die Signalintensität von Ntcp war unverändert zu den Ergebnissen nach Ischämie und Reperfusion ($53,7 \pm 11,4 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 12). Die Struktur des Membransignals war identisch zu den Lebern nach Ischämie und Reperfusion (Abb. 11). Die Densitometrie von Oatp1a1 ($97,3 \pm 3,9 \%$), Oatp1a4 ($87,9 \pm 7,6 \%$) und von Oatp1b2 ($95,6 \pm 4,5 \%$) ergab in perivenösen Leberzellen keine signifikante Unterschiede zu Lebern nach Ischämie und Reperfusion (Abb. 14, Abb. 17, Abb. 19). Die Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten direkt um die Zentralvene herum zeigten weiterhin eine niedrige Expression von Oatp1a4 ($60,24 \pm 6,14 \%$, nicht signifikant vs. Kontrolle, Abb. 17). In periportalen Hepatozyten wurden Oatp1a4 ($103,6 \pm 3,2 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) und Oatp1b2 ($80,1 \pm 3,4 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) induziert (Abb. 17, Abb. 19).

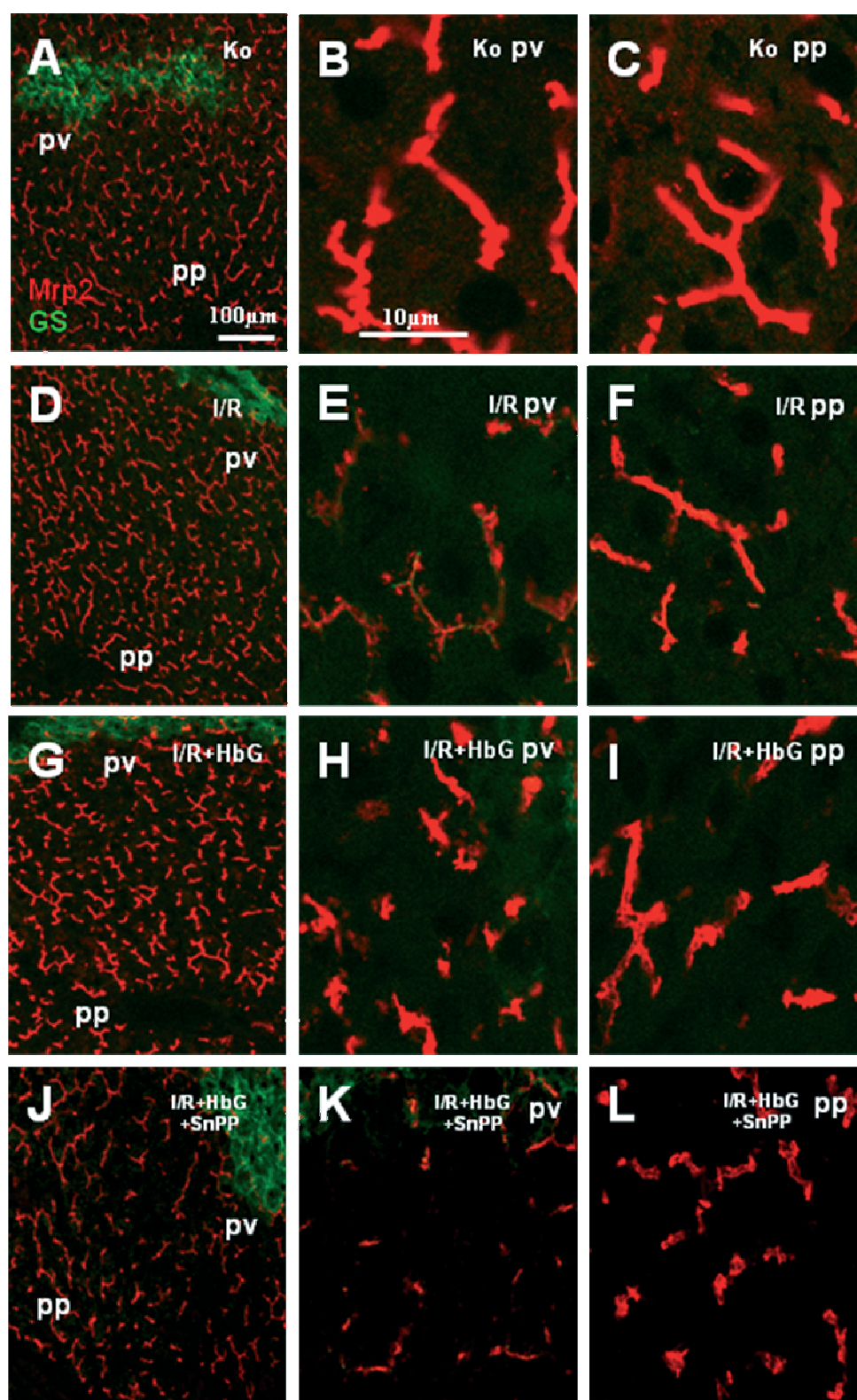


Abb.5: Lokalisation von Mrp2 und Glutaminsynthetase. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Mrp2 (EAG 15.4, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jeweils 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der pv und pp Hepatozyten bestimmt. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 μ m; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 μ m; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

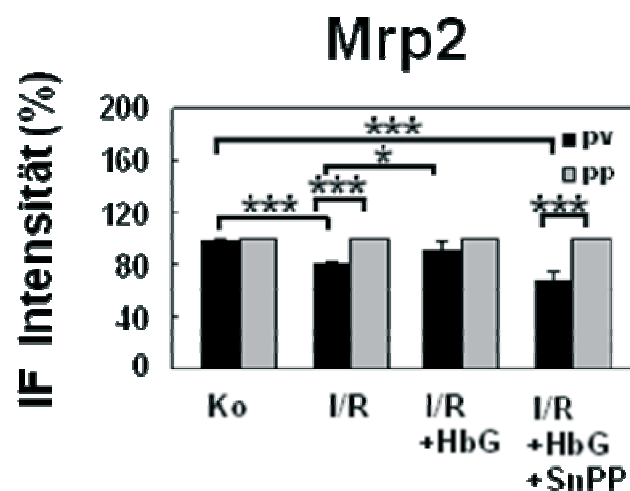


Abb.6: Quantitative Immunfluoreszenz von Mrp2. Es wurden von je 4 Tieren pro Versuchsgruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und periportal Leberzellen bestimmt und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion, IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal, (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu den Kontrolltieren).

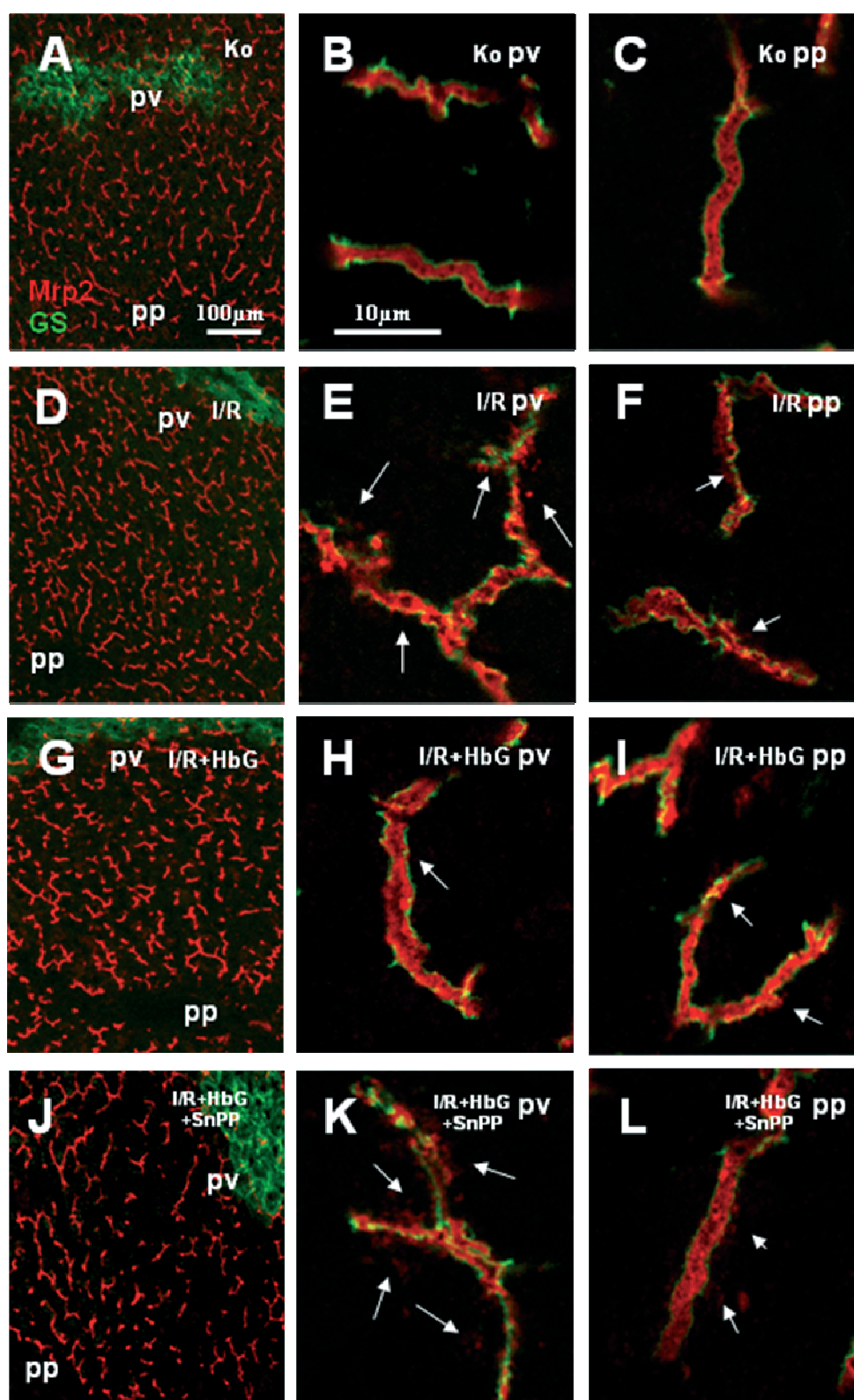


Abb.7: Lokalisation von Mrp2 und ZO-1. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Mrp2 (EAG 15.4, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) (A, D, G, J) oder einem polyklonalen Antikörper gegen "tight junctions" (ZO-1, grün) (B, C, E, F, H, I, K, L), als Marker für die kanalikuläre Membran, inkubiert. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 µm; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

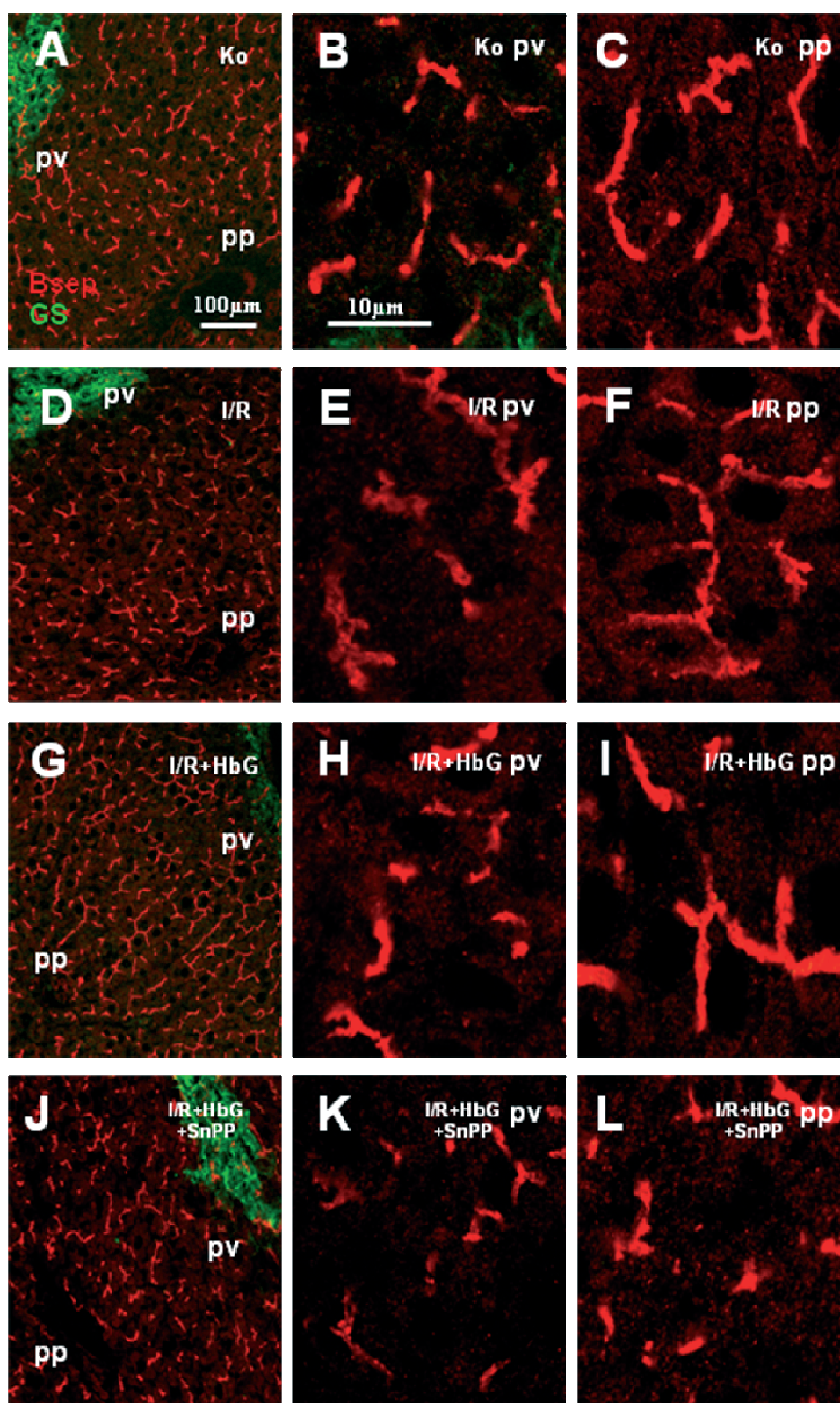


Abb.8: Lokalisation von Bsep und Glutaminsynthetase. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bsep (K44, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jeweils 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der pv und pp Hepatozyten bestimmt. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 µm; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

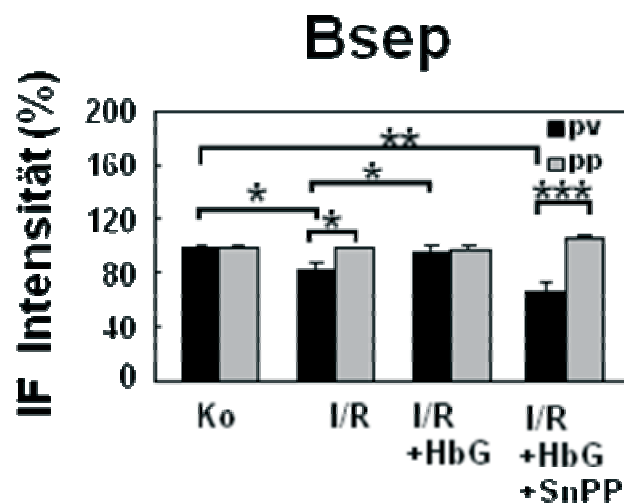


Abb.9: Quantitative Immunfluoreszenz von Bsep. Es wurden von je 4 Tieren pro Versuchsgruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und periportal Leberzellen bestimmt und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion, IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal, (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu den Kontrolltieren).

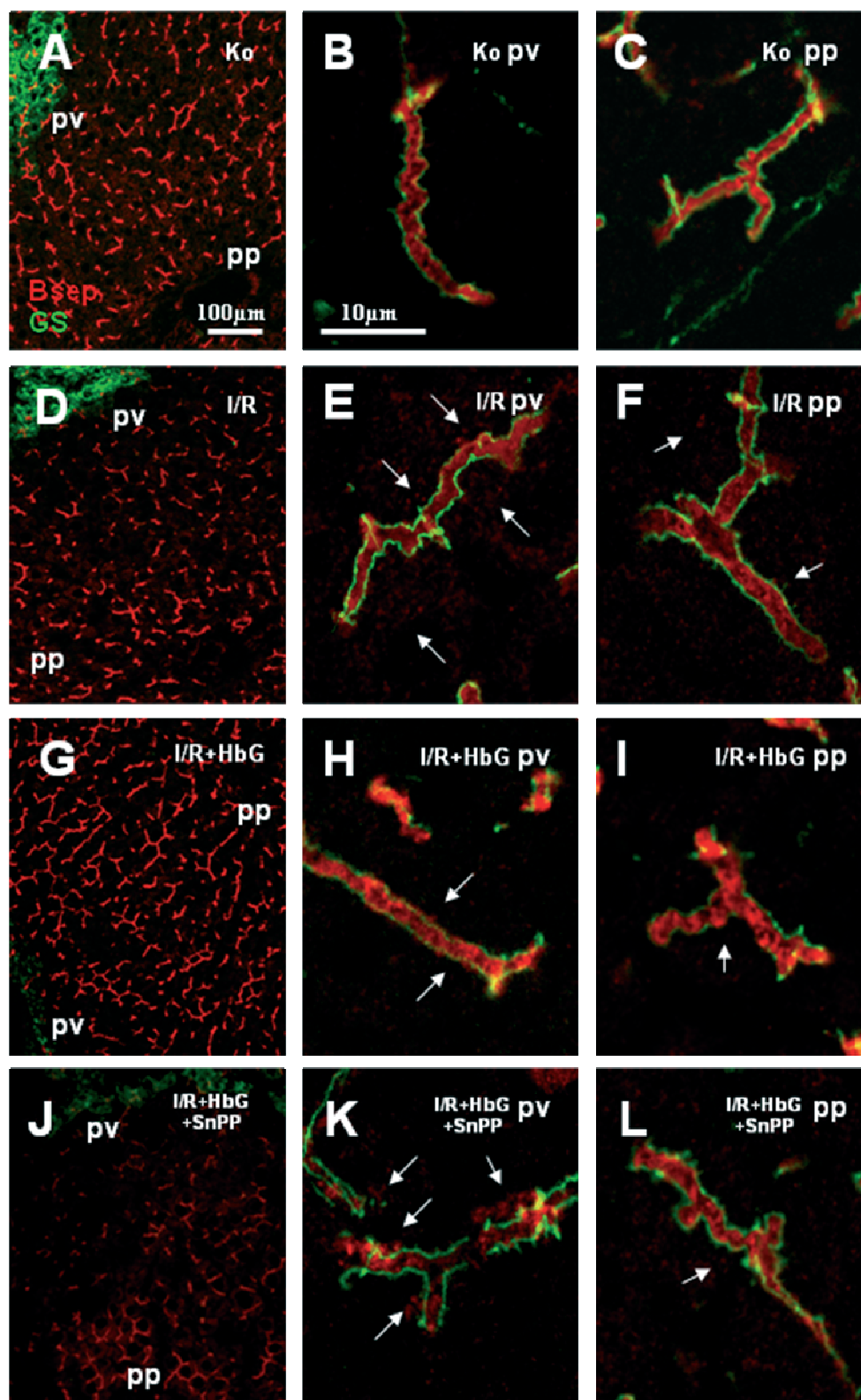


Abb.10: Lokalisation von Bsep und ZO-1. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bsep (K44, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün) (A, D, G, J) oder einem polyklonalen Antikörper gegen "tight junctions" (ZO-1, grün) (B, C, E, F, H, I, K, L), als Marker für die kanalikuläre Membran, inkubiert. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 µm; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

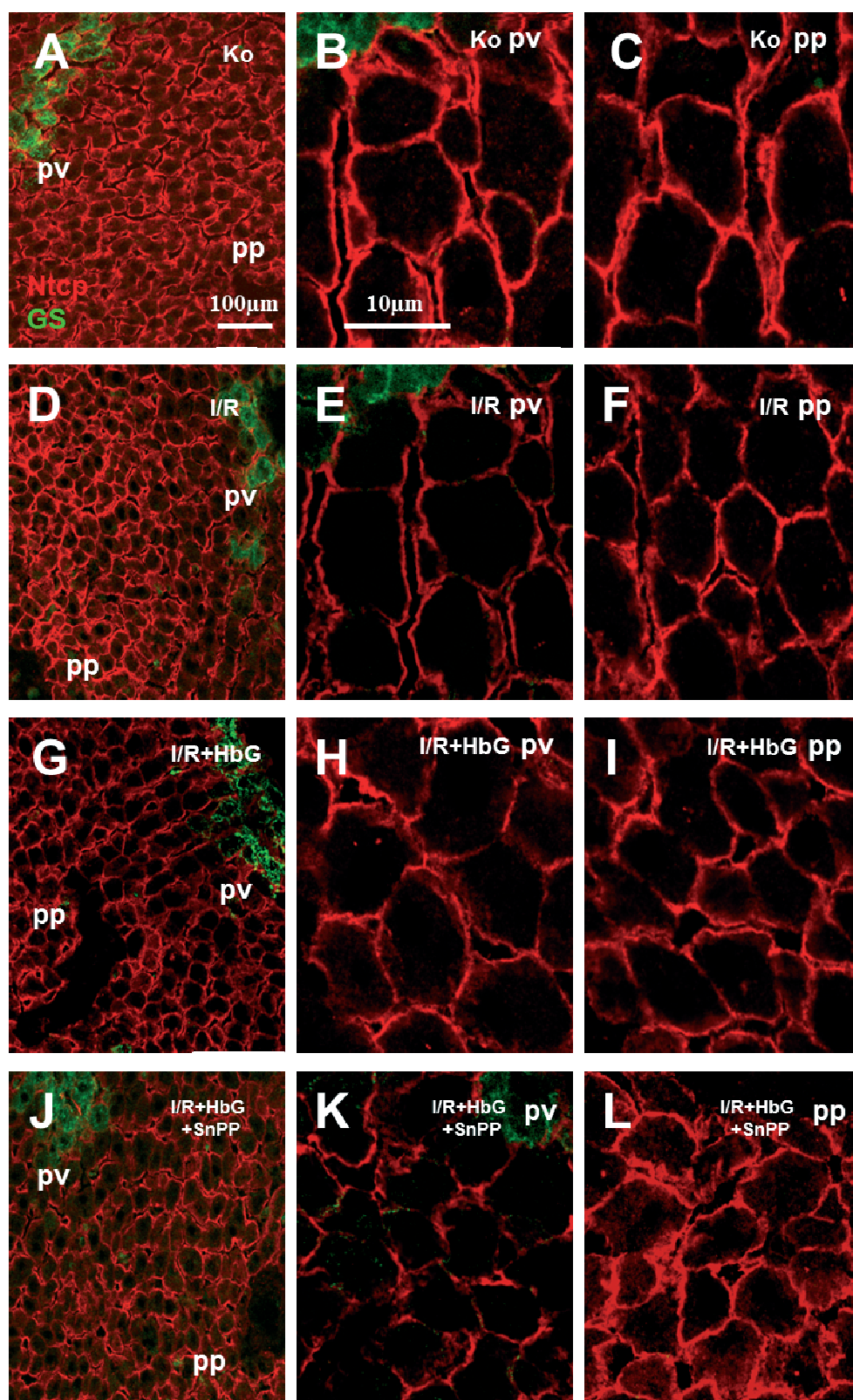


Abb.11: Lokalisation von Ntcp und Glutaminsynthetase. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ntcp (K4, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jeweils 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der pv und pp Hepatozyten bestimmt. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 µm; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

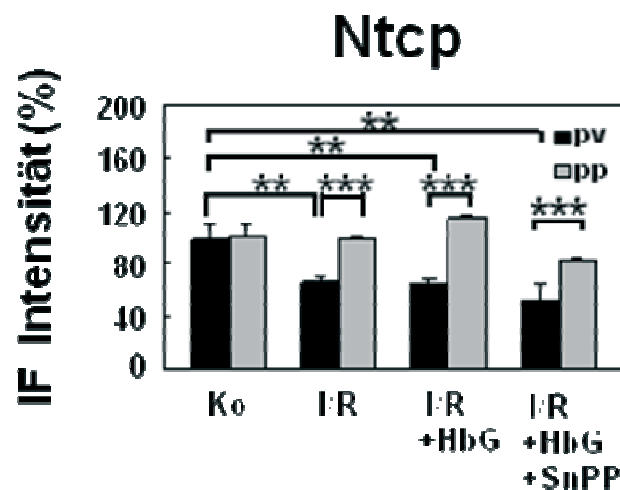


Abb.12: Quantitative Immunfluoreszenz von Ntcp. Es wurden von je 4 Tieren pro Versuchsgruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und periportal Leberzellen bestimmt und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion, IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal, (* $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu den Kontrolltieren).

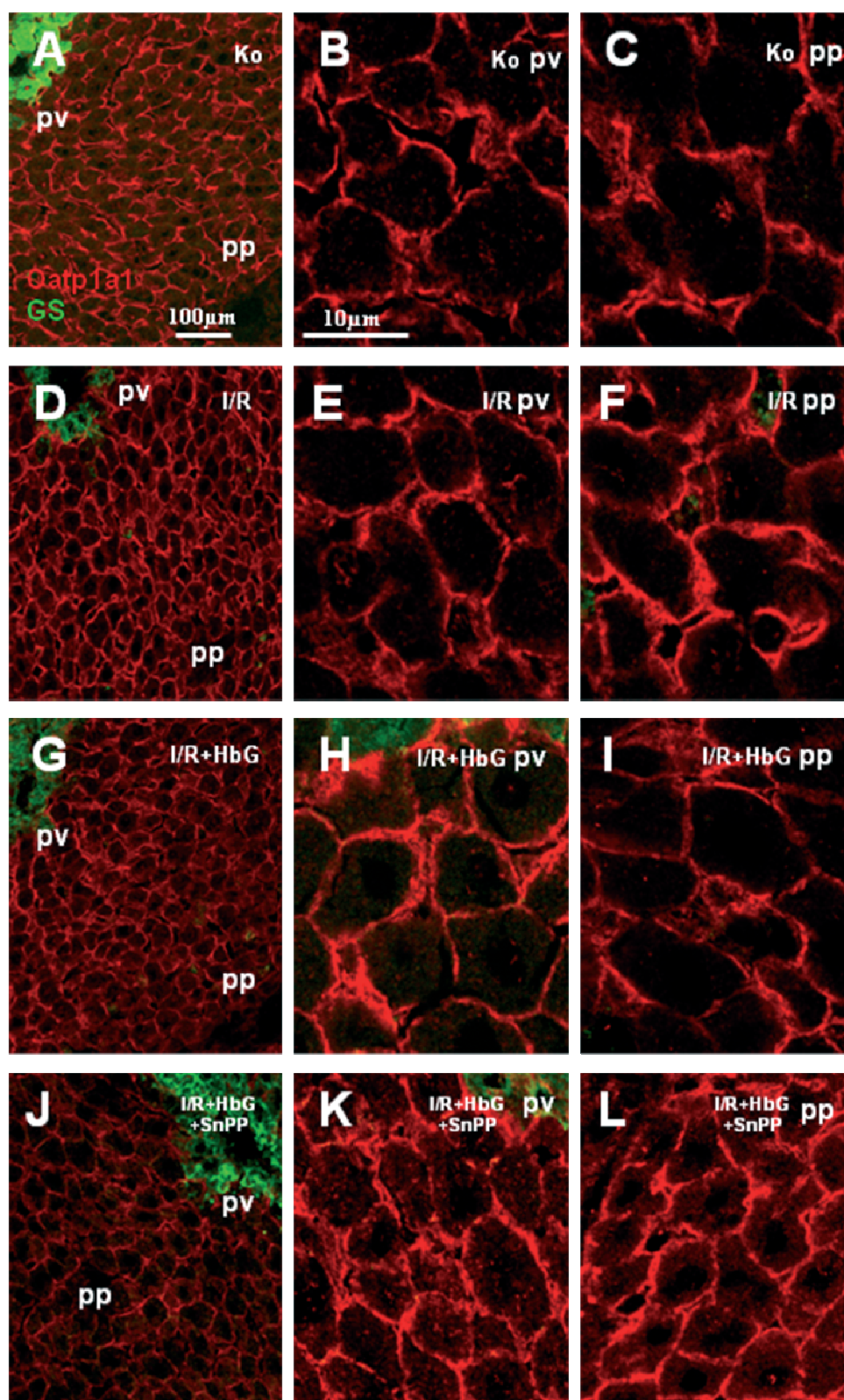


Abb.13: Lokalisation von Oatp1a1 und Glutaminsynthetase. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Oatp1a1 (K10, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jeweils 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der pv und pp Hepatozyten bestimmt. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 µm; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

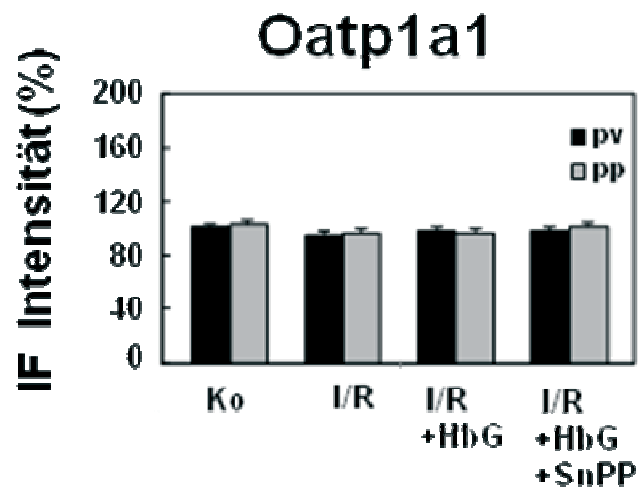


Abb.14: Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a1. Es wurden von je 4 Tieren pro Versuchsgruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und periportal Leberzellen bestimmt und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion, IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal, (nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren).

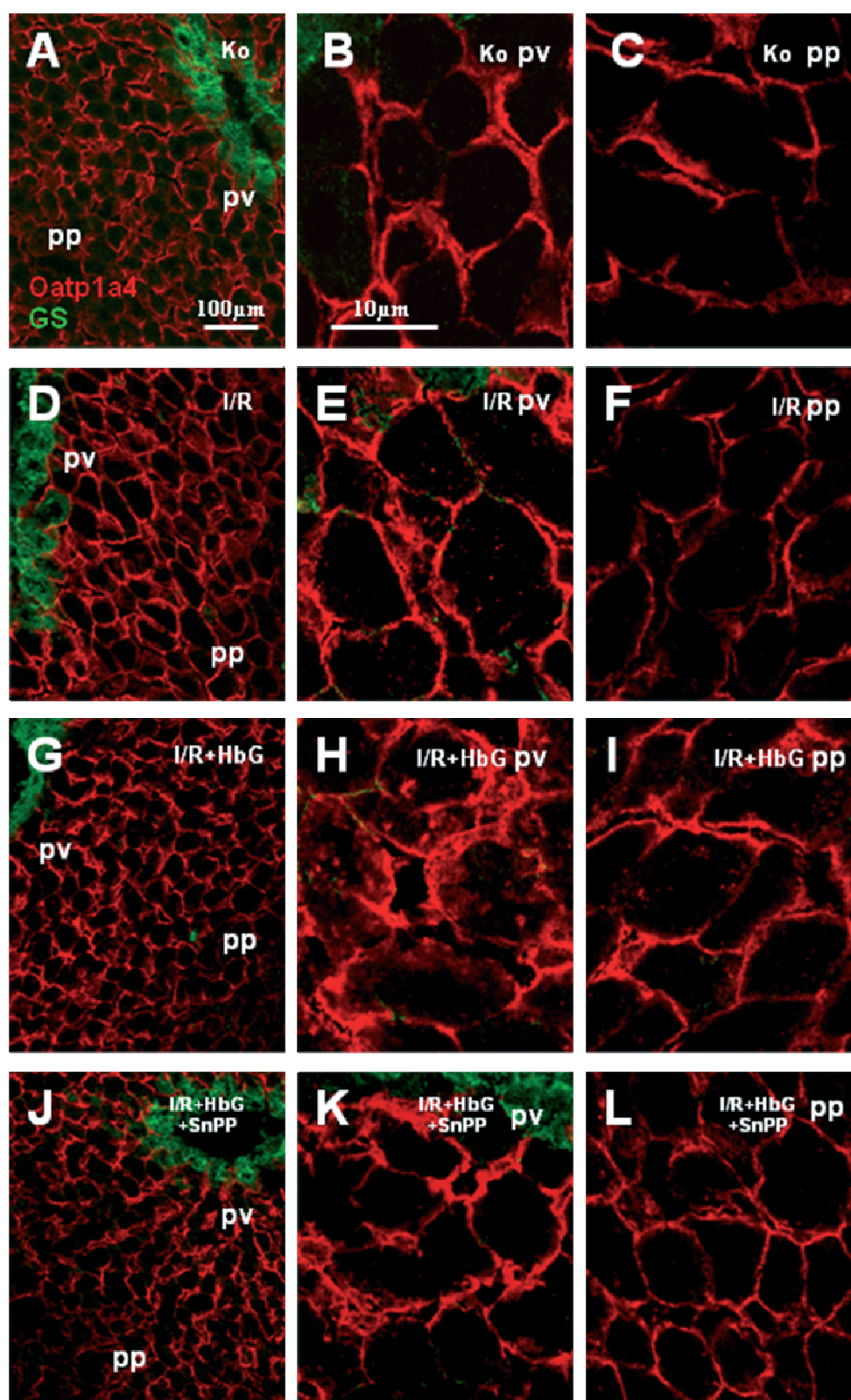


Abb.15: Lokalisation von Oatp1a4 und Glutaminsynthetase. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Oatp1a4 (K15, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jeweils 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der pv und pp Hepatozyten bestimmt. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 µm; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

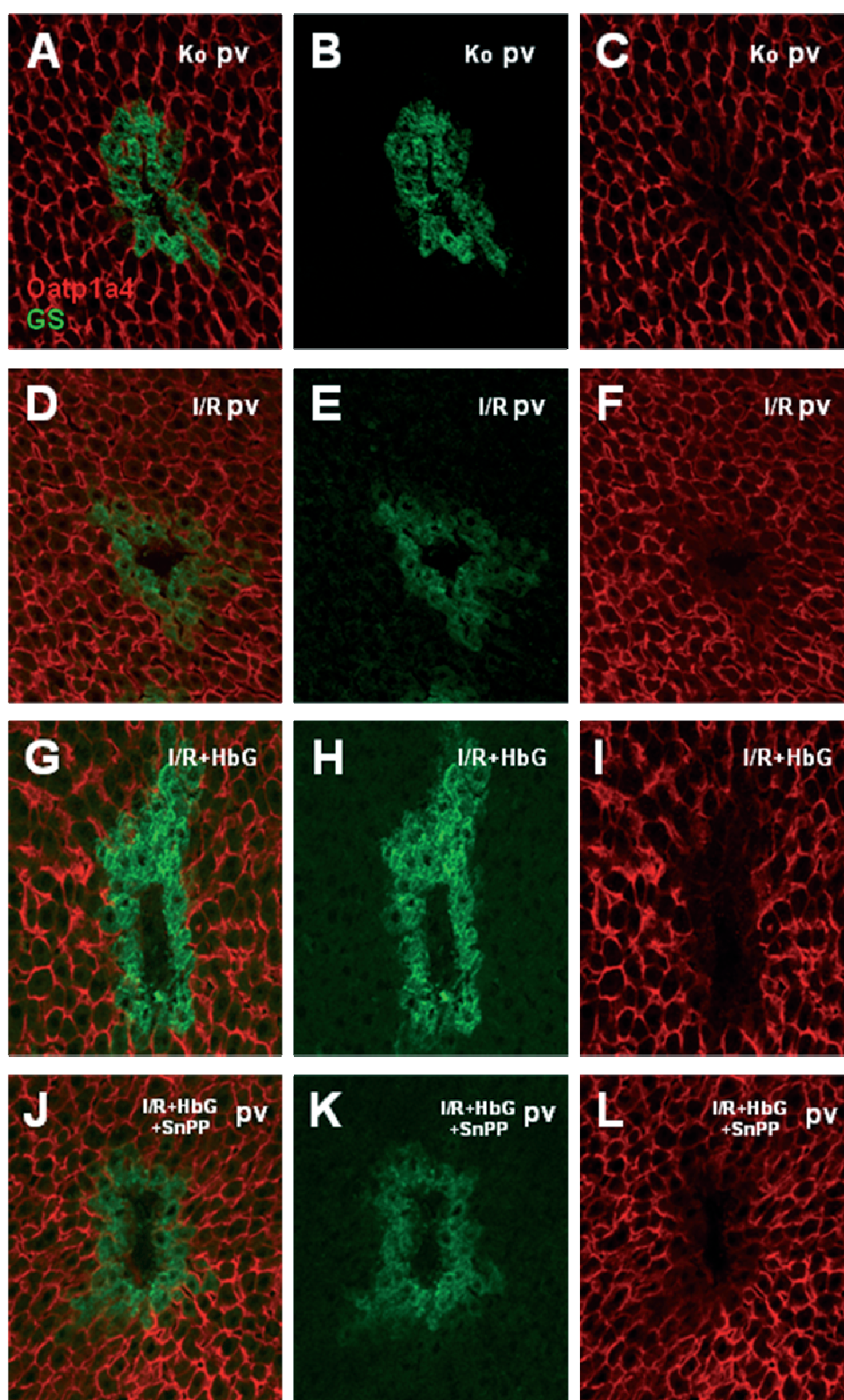


Abb.16: Lokalisation von Oatp1a4 im Bereich der Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Oatp1a4 (K15, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurde von 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten im Bereich der Zentralvene bestimmt. A, Ko pv; B, Ko pv Glutaminsynthetase; C, Ko pv ohne Glutaminsynthetase; D, IR pv; E, IR pv Glutaminsynthetase; F, IR pv ohne Glutaminsynthetase; G, IR+HbG-200 pv; H, IR+HbG-200 pv Glutaminsynthetase; I, IR+HbG-200 pv ohne Glutaminsynthetase; J, IR+HbG-200+SnPP IX pv; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv Glutaminsynthetase; L, IR+HbG-200+SnPP IX pv ohne Glutaminsynthetase; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös.

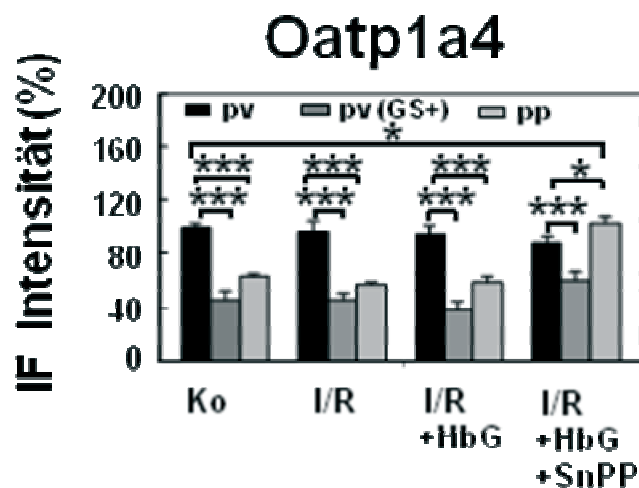


Abb.17: Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1a4. Es wurden von je 4 Tieren pro Versuchsgruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und periportal Leberzellen bestimmt und mit den Kontrolltieren verglichen. Zusätzlich wurde von 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten im Bereich der Zentralvene bestimmt. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion, IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pv (GS+), Glutaminsynthetase positive perivenöse Hepatozyten; pp, periportal, (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu den Kontrolltieren).

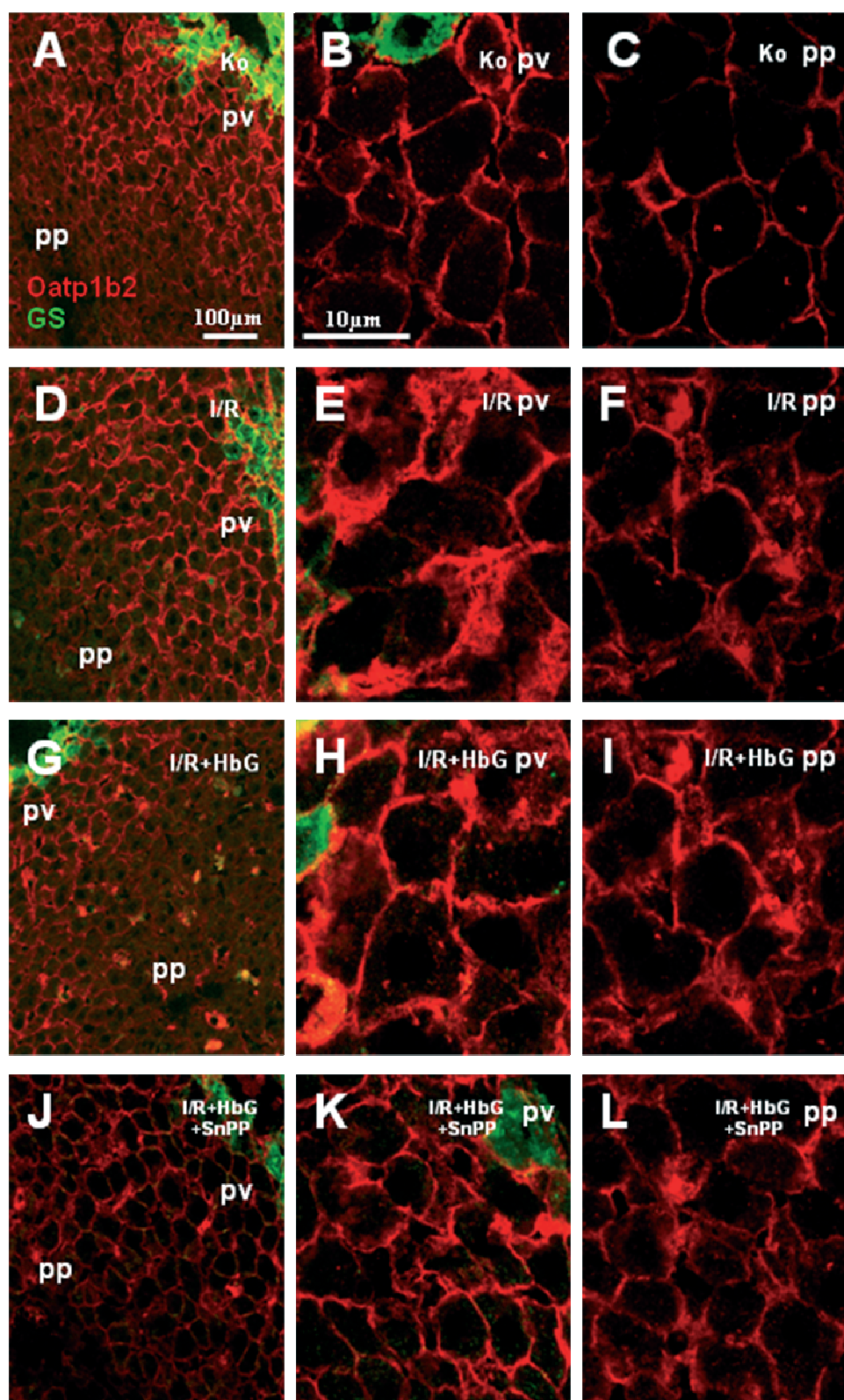


Abb.18: Lokalisation von Oatp1b2 und Glutaminsynthetase. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Oatp1b2 (K22, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jeweils 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der pv und pp Hepatozyten bestimmt. A, Ko; B, Ko pv; C, Ko pp; D, IR; E, IR pv; F, IR pp; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200 pv; I, IR+HbG-200 pp; J, IR+HbG-200+SnPP IX; K, IR+HbG-200+SnPP IX pv; L, IR+HbG-200+SnPP IX pp; Balken A, D, G, J = 100 µm; Balken B, C, E, F, H, I, K, L = 10 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal.

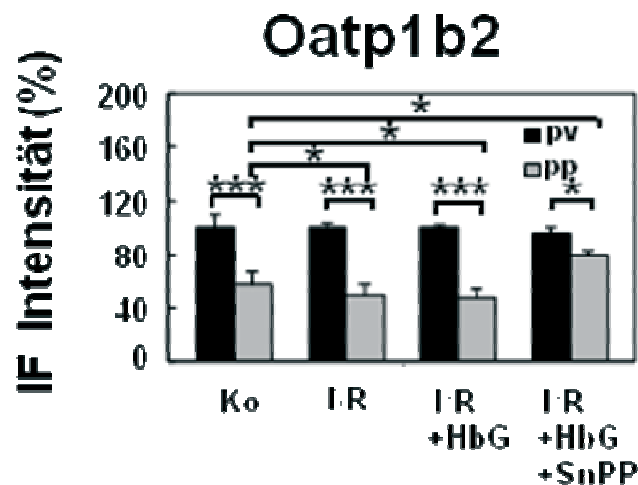


Abb.19: Quantitative Immunfluoreszenz von Oatp1b2. Es wurden von je 4 Tieren pro Versuchsgruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und periportal Leberzellen bestimmt und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion, IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX, pv, perivenös; pp, periportal, (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu den Kontrolltieren).

4.1.5 Induktion der Hämoxxygenase-1 durch Hämoglobin Glutamer-200

In der Immunfluoreszenz wurde optisch die Lokalisation der Hämoxxygenase-1 durch kalte Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert. Wie auch bei den Kontrolltieren war die Expression der HO-1 hauptsächlich auf die Kupffer-Zellen begrenzt. Durch die Induktion der HO-1 mit Hämoglobin Glutamer-200 zeigte sich in den Hepatozyten um die Zentralvene optisch eine deutliche Induktion der Hämoxxygenase-1. In den Kupffer-Zellen und in den periportalen Hepatozyten war die Lokalisation und Intensität der HO-1 nicht verändert (Abb. 20).

4.1.6 Pharmakologische Hemmwirkung des SnProtoporphyrin IX auf die Hämoxxygenase-1

Nach der gemeinsamen Vorbehandlung mit HbG-200 und SnPP IX konnte die Lokalisation der HO-1 unverändert in perizentralen Hepatozyten dargestellt werden (Abb. 20).

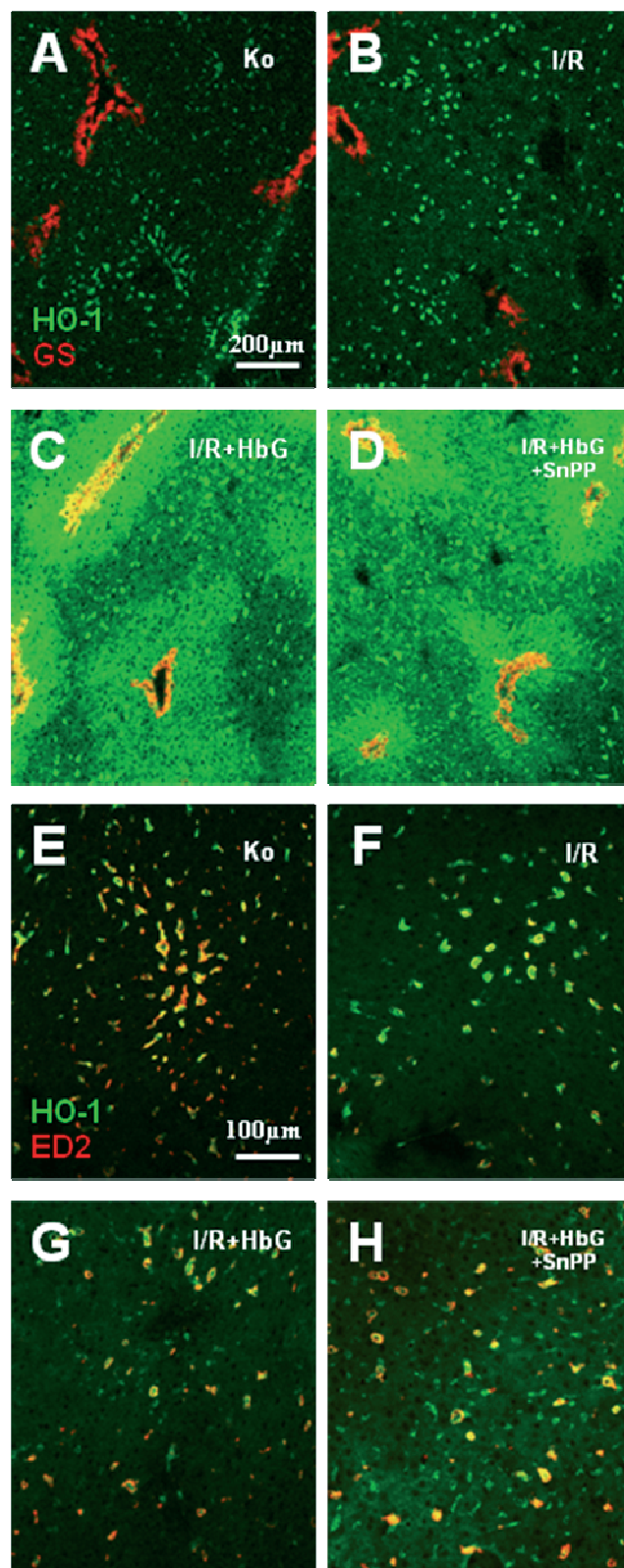


Abb.20: Zellspezifische Lokalisation und Expression der Hämoxygenase-1 nach Induktion mit Hämoglobin Glutamer-200. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen HO-1 (grün) und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (rot), oder einem polyklonalen Antikörper gegen HO-1 (grün) und einem polyklonalen Antikörper gegen Kupffer-Zellen (ED2, rot), inkubiert. A, Ko; B, IR; C, IR+HbG-200; D, IR+HbG-200+SnPP IX; E, Ko; F, IR; G, IR+HbG-200; H, IR+HbG-200+SnPP IX; Balken A, B, C, D = 200 µm; Balken E, F, G, H = 100 µm; Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX.

4.1.7 Effekt der Präkonditionierung von Kontrolltieren mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX auf die Lokalisation hepatobiliärer Transporter

Zum Ausschluss möglicher pharmakologischer Effekte der Präkonditionierungssubstanzen Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX auf die Transporterexpression von Kontrolltieren wurden entsprechende Kontrolldensitometrien durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass keiner der in dieser Arbeit untersuchten Membrantransporter durch die Präkonditionierungen signifikant verändert wurde. Mrp2 zeigte unter dem Einfluss von HbG-200 perivenös eine Signalintensität von $98,3 \pm 1,2$ % und periportal eine Signalintensität von $100,6 \pm 1,0$ %. Durch die Präkonditionierung mit SnPP IX lagen die Membransignale perivenös bei $96,7 \pm 1,6$ % und periportal bei $97,1 \pm 0,5$ % (nicht signifikant, Abb. 21, Abb. 22). Durch die Behandlung mit HbG-200 blieb das Bsep Membransignal in perivenösen Hepatozyten mit $100,4 \pm 1,9$ % und in periportal Hepatozyten mit $98,4 \pm 2,5$ % unverändert. Unter dem Einfluss von SnPP IX konnten bei Bsep Membrantransporterintensitäten in perivenösen Hepatozyten von $100,2 \pm 2,7$ % und in periportal Hepatozyten von $99,0 \pm 1,1$ % ermittelt werden (nicht signifikant, Abb. 21, Abb. 22).

Ntcp wies nach der Vorbehandlung mit HbG-200 perivenöse Membransignale von $106,0 \pm 2,0$ und periportale Membransignale von $109,4 \pm 7,5$ % auf. Nach der Präkonditionierung mit SnPP IX zeigten sich perivenös Signalstärken von $99,2 \pm 2,0$ % und periportal von $100,8 \pm 1,5$ % (nicht signifikant, Abb. 21, Abb. 22). Bei Oatp1a1 wurde das perivenöse Membransignal durch HbG-200 auf $104,60 \pm 2,0$ % und das periportale Membransignal auf $102,5 \pm 2,6$ % verändert. Nach der Behandlung mit SnPP IX zeigte sich perivenös eine Signalintensität von $110,2 \pm 1,2$ und periportal von $113,3 \pm 3,8$ % (nicht signifikant, Abb. 21, Abb. 22). Die Membransignalintensität von Oatp1a4 lag unter HbG-200-Einfluss in perivenösen Hepatozyten bei $97,4 \pm 4,0$ %, in periportal Hepatozyten bei $58,1 \pm 1,8$ % und in GS-positiven Zellen bei $46,7 \pm 2,6$ %. Die Vorbehandlung mit SnPP IX ergab perivenös eine Signalintensität

von $96,9 \pm 4,0$ %, periportal von $56,2 \pm 1,1$ % und in GS-positiven Hepatozyten Messwerte von $45,2 \pm 2,8$ % (nicht signifikant, Abb. 21, Abb. 22). Das Oatp1b2 Membransignal lag nach Behandlung mit HbG-200 in perivenösen Hepatozyten bei $100,4 \pm 1,9$ % und in periportalen Hepatozyten bei $98,4 \pm 2,53$ %. Nach SnPP IX war das Hepatozytenmembransignal in perivenösen Hepatozyten bei $101,27 \pm 1,33$ % und in periportalen Hepatozyten bei $75,76 \pm 7,24$ % (nicht signifikant, Abb. 21, Abb 22).

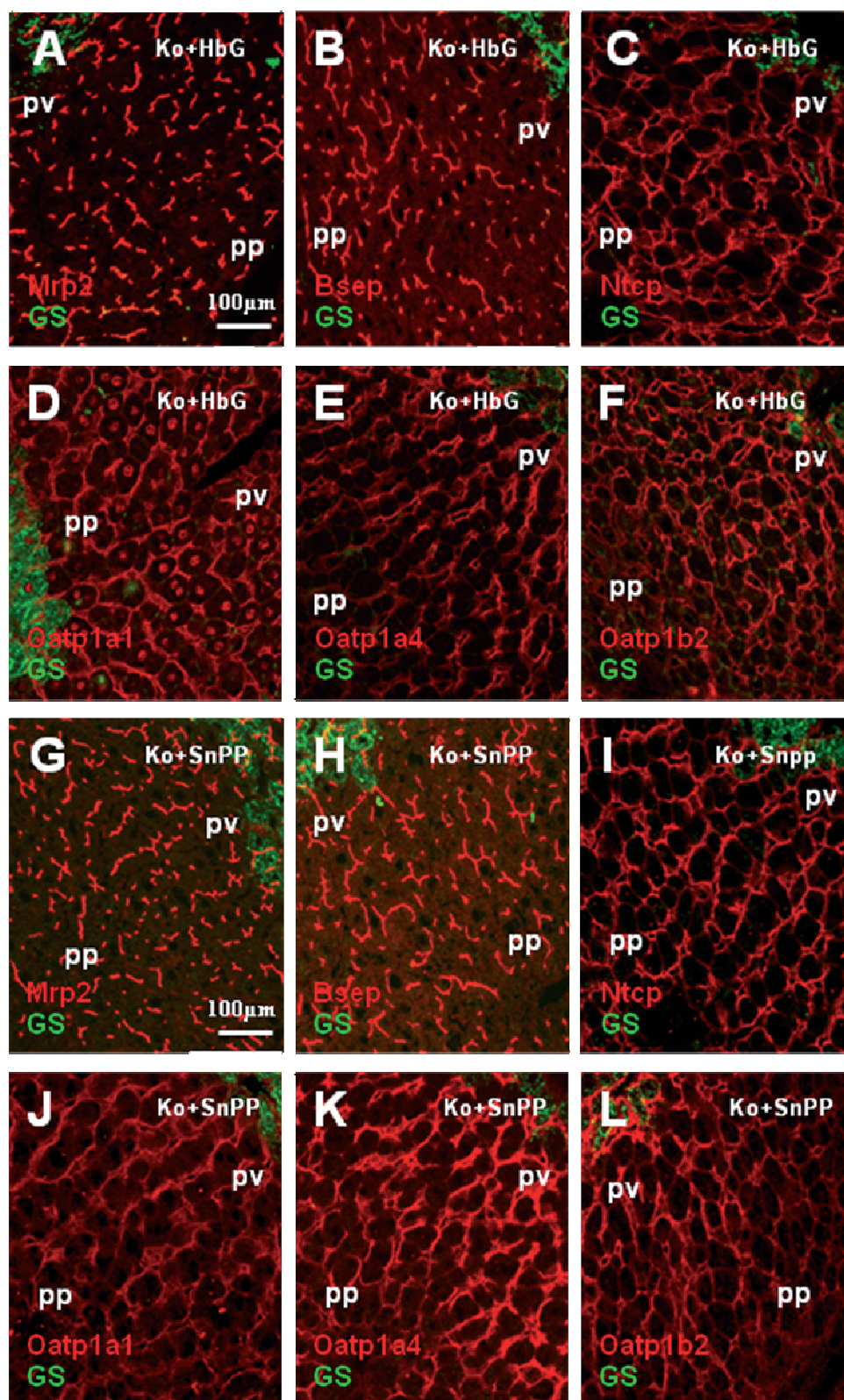
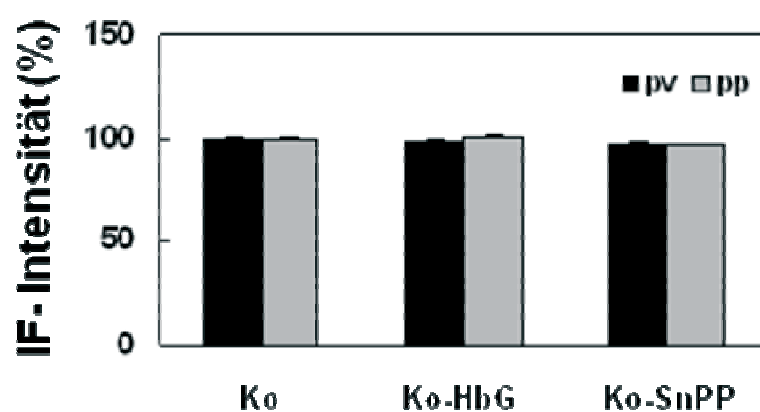
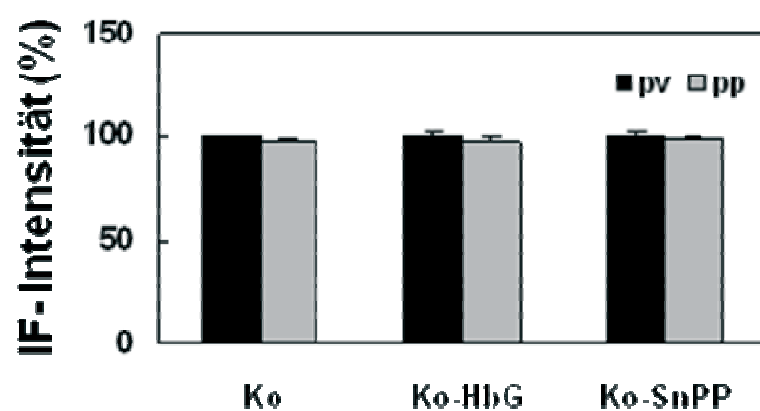


Abb.21: Immunfluoreszenz von Kontrollieren nach Präkonditionierung mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX. Die Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Mrp2 (EAG 15.4), Bsep (K44), Ntcp (K4), Oatp1a1 (K10), Oatp1a4 (K15) oder Oatp1b2 (K22) rot und einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase (grün), als Marker für die pv Hepatozyten, inkubiert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jeweils 4 Tieren pro Gruppe die Signalintensität von 10 Membranen der pv und pp Hepatozyten bestimmt. A-F, Ko+HbG-200; G-L, Ko-SnPP IX, Balken A-L = 100 µm; pv, perivenös; pp, periportal.

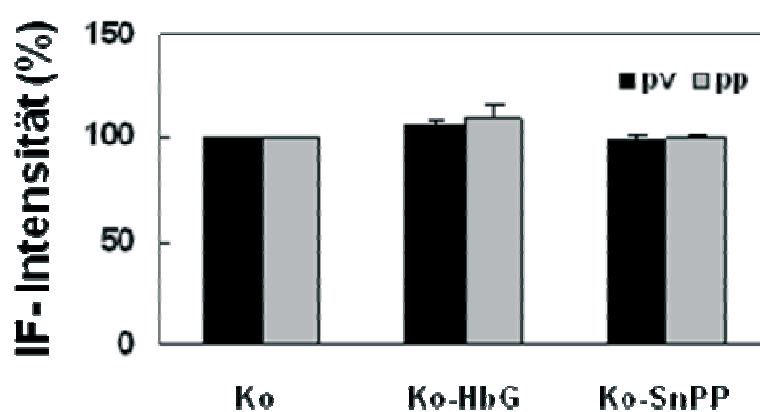
Mrp2



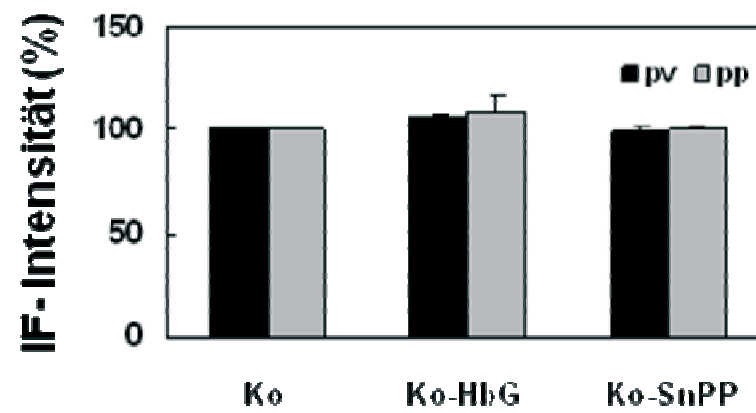
Bsep



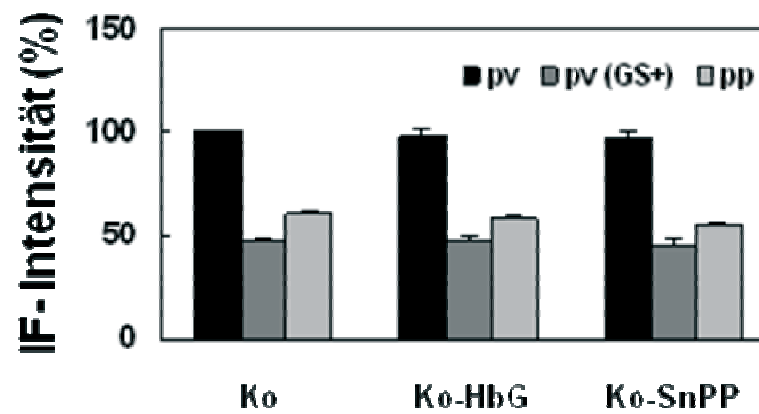
Ntcp



Oatp1a1



Oatp1a4



Oatp1b2

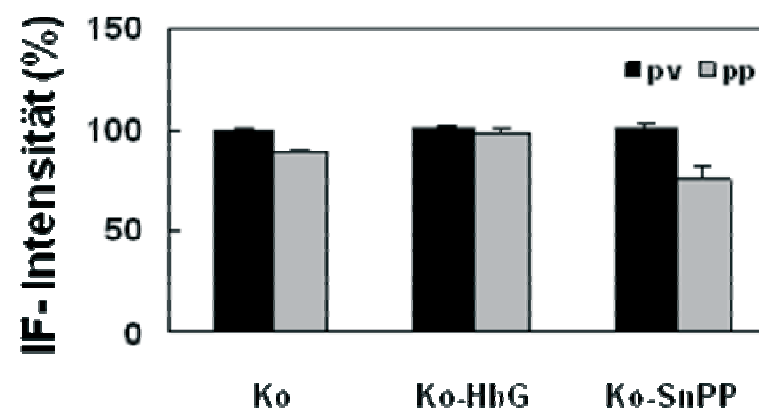


Abb.22: Quantitative Immunfluoreszenz von Kontrolltieren. Es wurden von je 4 Tieren pro Versuchsgruppe die Signalintensitäten von 10 Membranen der perivenösen und periportal Leberzellen bestimmt und mit den vorbehandelten Versuchstieren verglichen. Ko, Kontrolle; Ko-HbG, Kontrolle mit Hämoglobin Glutamer-200, Ko-SnPP, Kontrolle mit SnProtoporphyrin IX , pv, perivenös; pp, periportal, (nicht signifikant).

4.2 Western Blot

Zur Western-Blot-Analyse wurden Gesamtmembranen durch Ultrazentrifugation aus Leberhomogenaten präpariert. Nach der Inkubation mit "Loading-Buffer" wurden die Proteine entsprechend ihres spezifischen Molekulargewichtes auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurden die Membranen mit einem Primärantikörper inkubiert. Die untersuchten Proteine wurden bei folgenden Molekulargewichten detektiert: Mrp2 bei 180 kDa, Bsep bei 180 kDa, Ntcp bei 50 kDa, Oatp1a1 und Oatp1a4 bei 75 kDa, Oatp1b2 bei 85 kDa und HO-1 bei 32 kDa. Als Beladungskontrolle wurde β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa mitgeführt.

4.2.1 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern bei Kontrolltieren

Die Proteinexpression der unbehandelten Kontrolltiergruppen wurde bei allen untersuchten Transportern mit 100 % als Mittelwert gleichgesetzt (Abb. 23).

4.2.2 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach kalter Ischämie und Reperfusion

Nach 44 Stunden kalter Ischämie und Reperfusion war die Proteinexpression von Mrp2 auf $74,0 \pm 16,0$ % reduziert ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 23, Abb. 24). Die Expression von Bsep war auf $68,0 \pm 15,0$ % herabreguliert ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 23, Abb. 24). Die Proteinexpression von Ntcp ($108,0 \pm 28,0$ %), von Oatp1a1 ($102,0 \pm 32,0$ %), Oatp1a4 ($115,0 \pm 59,0$ %) und Oatp1b2 ($99,0 \pm 13,0$ %) war unter den Versuchsbedingungen nicht signifikant verändert (Abb. 23, Abb. 24).

4.2.3 Effekt der Induktion der Hämoxxygenase-1 auf die Proteinexpression hepatobiliärer Transporter

Die Präkonditionierung mit Hämoglobin Glutamer-200 führte zu einer signifikanten Steigerung der hepatischen Proteinexpression von Bsep ($p \leq 0,05$ im Vergleich zu mit HbG-200 vorbehandelten Tieren). Die Proteinexpression der anderen hier untersuchten Membrantransporter zeigte im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Veränderungen. Mrp2 wies eine Proteinexpression von $110,0 \pm 17,0 \%$, Bsep von $140,3 \pm 32,0 \%$, Ntcp von $82,3 \pm 27,0 \%$, Oatp1a1 von $110,0 \pm 26,0 \%$, Oatp1a4 von $117,0 \pm 29,0 \%$ und Oatp1b2 von $72,0 \pm 13,0 \%$ auf (Abb.23, Abb. 24).

4.2.4 Effekt der pharmakologischen Hemmung der Hämoxxygenase-1 mit SnProtoporphyrin IX auf die Proteinexpression hepatobiliärer Transporter

Nach pharmakologischer Hemmung der HO-1-Induktion mittels SnPP IX war die Proteinexpression von Mrp2 signifikant reduziert ($69,0 \pm 11,0 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb.23, Abb. 24). Die Proteinexpression von Bsep war unverändert zu den Kontrollen, jedoch signifikant geringer als in den mit HbG-200 vorbehandelten Lebern ($114,0 \pm 35,0 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb 23., Abb. 24). Die Expression von Ntcp war auf $75,0 \pm 20,0 \%$ reduziert ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb.23, Abb. 24). Die Proteinexpression von Oatp1a1 war nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen ($137,0 \pm 24,0 \%$). Die Expression von Oatp1a4 ($218,0 \pm 34,0 \%$) und Oatp1b2 ($147,0 \pm 22,0 \%$) war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb.23, Abb. 24).

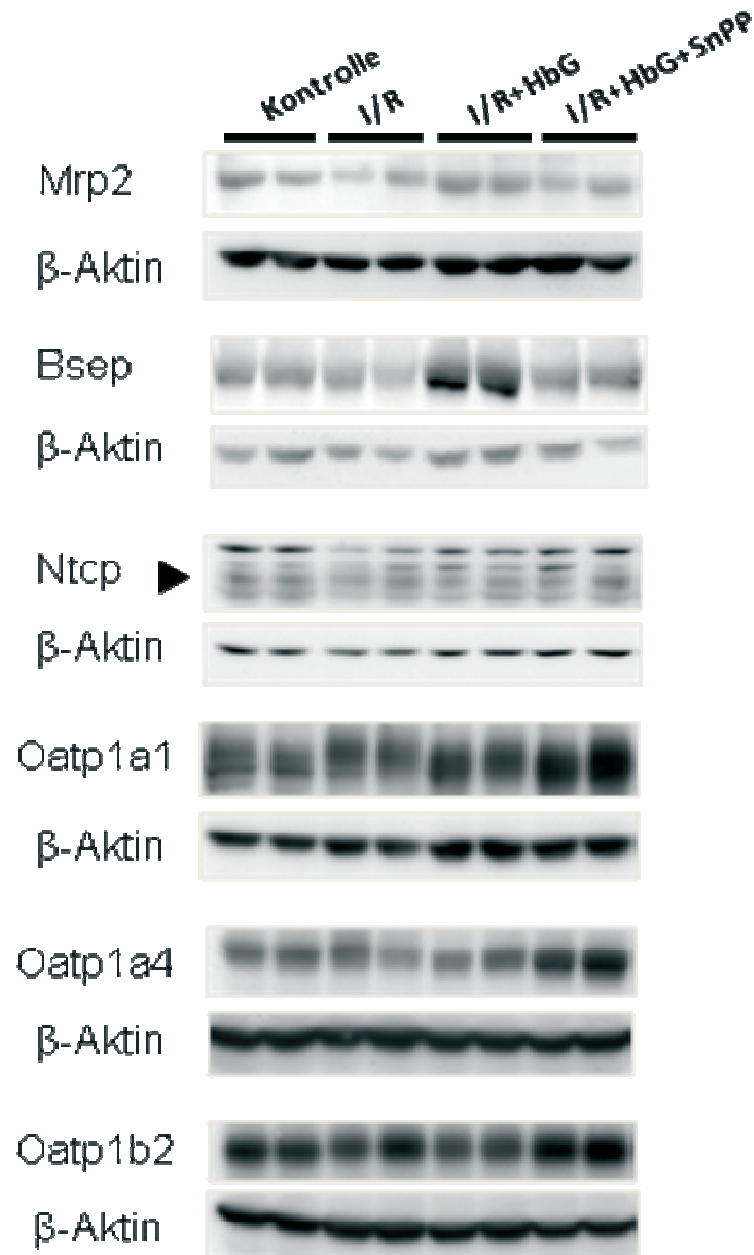


Abb.23: Immunoblot-Analyse von Mrp2, Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 nach kalter Ischämie und Reperfusion sowie der Effekt der Induktion von HO-1. Die Gesamtmembranfraktionen der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. β-Aktin wurde als Beladungskontrolle eingesetzt. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX.

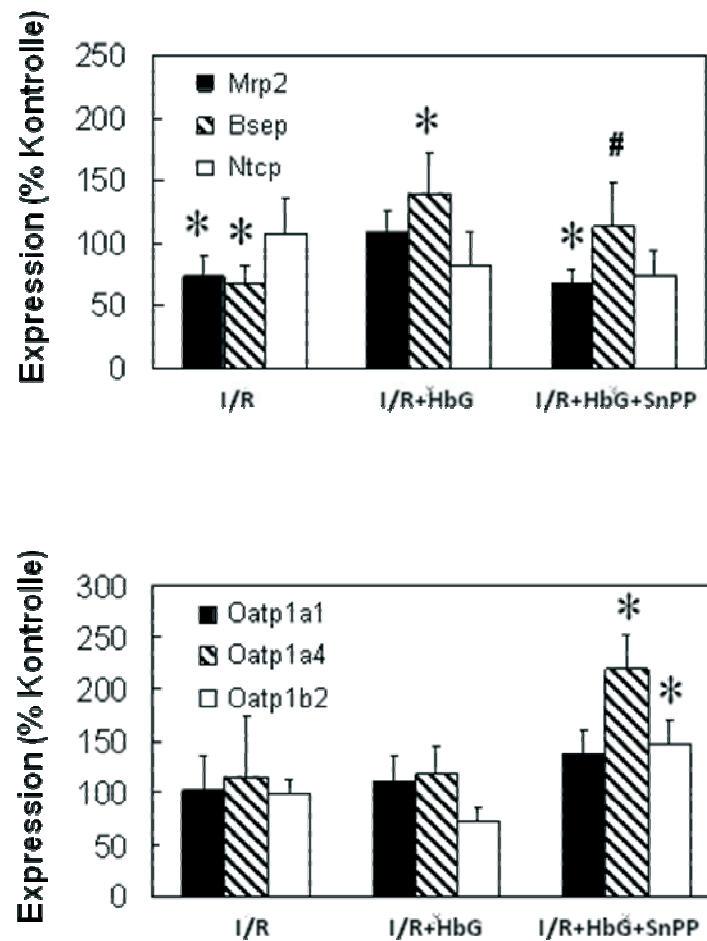


Abb.24: Quantitative Proteinexpression von Mrp2, Bsep, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 nach kalter Ischämie und Reperfusion sowie der Effekt der Induktion von HO-1. Für die densitometrische Analyse wurden je 4 Tieren pro Versuchsgruppe getestet und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollen, # $p \leq 0,05$ im Vergleich zu mit HbG-200 vorbehandelten Tieren).

4.2.5 Induktion der Hämoxxygenase-1 durch Hämoglobin Glutamer-200

Die Kontrollgruppe zeigte eine Proteinexpression der HO-1 von $100,0 \pm 34,0$ %. Nach Ischämie und Reperfusion zeigte sich in der Leber eine nahezu unveränderte Proteinexpression von $107,0 \pm 62,0$ %. Bei der mit HbG-200 vorbehandelten Gruppe wurde die HO-1 signifikant induziert auf $2779,0 \pm 407,0$ % ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb.25, Abb. 26).

4.2.6 Wirkung des SnProtoporphyrin IX auf die Proteinexpression der Hämoxxygenase-1

Die Hemmung der positiven Wirkung der Hämoxxygenase-1 auf die Membrantransporter durch SnProtoporphyrin IX beruht auf einer klinischen Wirkung in vivo. Die Proteinexpression der Hämoxxygenase-1 wird durch den Einsatz von SnProtoporphyrin IX nicht verändert (Proteinexpression der Hämoxxygenase-1 bei $1930,0 \pm 488,0$ %, $p < 0,05$ vs. I/R+HbG, Abb. 25, Abb. 26).

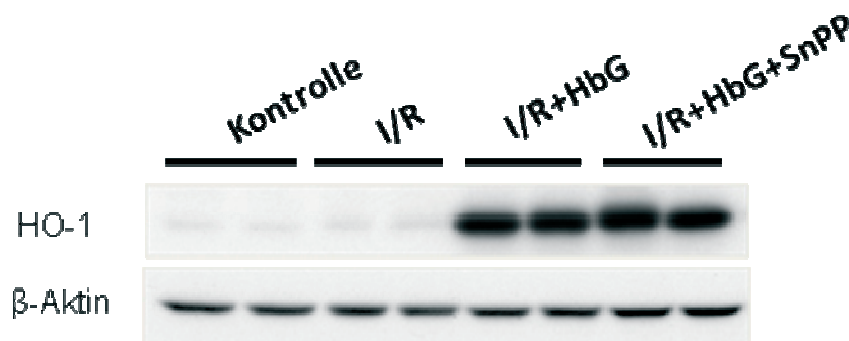


Abb.25: Immunoblot-Analyse von HO-1. Die Gesamtmembranfraktionen der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. β -Aktin wurde als Beladungskontrolle eingesetzt. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX.

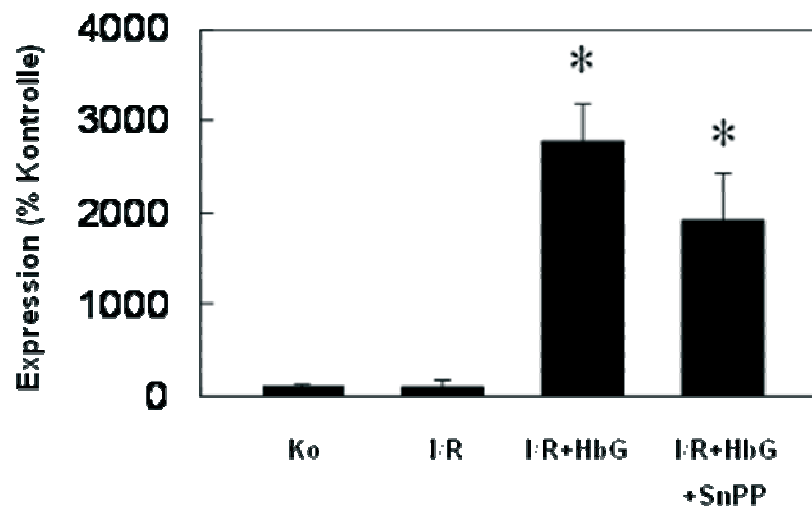


Abb.26: Quantitative Proteinexpression von HO-1. Für die densitometrische Analyse wurden je 4 Tieren pro Versuchsgruppe getestet und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und Protoporphyrin IX (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollen).

4.2.7 Effekt der Präkonditionierung von Kontrolltieren mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX auf die Proteinexpression hepatobiliärer Transporter

Zum Ausschluss möglicher pharmakologischer Effekte der Präkonditionierungssubstanzen Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX auf die Proteinexpression der Membrantransporter von Kontrolltieren, wurden entsprechende Western Blots angefertigt. Dabei zeigte sich, dass keiner der in dieser Arbeit untersuchten Membrantransporter durch die Präkonditionierungen signifikant verändert wurde. Unter der Präkonditionierung mit HbG-200 betrug die Proteinexpression von Mrp2 102 ± 15 %. Die Expression von Bsep lag bei 85 ± 12 %. Bei Ntcp konnte eine Proteinexpression von 96 ± 3 % gemessen werden. Die Expression von Oatp1a1 lag bei 79 ± 7 %, von Oatp1a4 bei 94 ± 3 % und von Oatp1b2 bei 115 ± 3 % (nicht signifikant, Abb. 27, Abb. 28). Unter der Präkonditionierung mit SnPP IX betrug die Proteinexpression von Mrp2 92 ± 14 %. Die Expression von Bsep lag bei 87 ± 9 %. Bei Ntcp konnte eine Proteinexpression von 85 ± 6 % gemessen werden. Die Expression von Oatp1a1 lag bei 116 ± 5 % ($p \leq 0,05$ im Vergleich zu den mit HbG-200 vorbehandelten Versuchstieren, von Oatp1a4 bei 112 ± 6 % und von Oatp1b2 bei 90 ± 9 % (nicht signifikant, Abb. 27, Abb. 28).

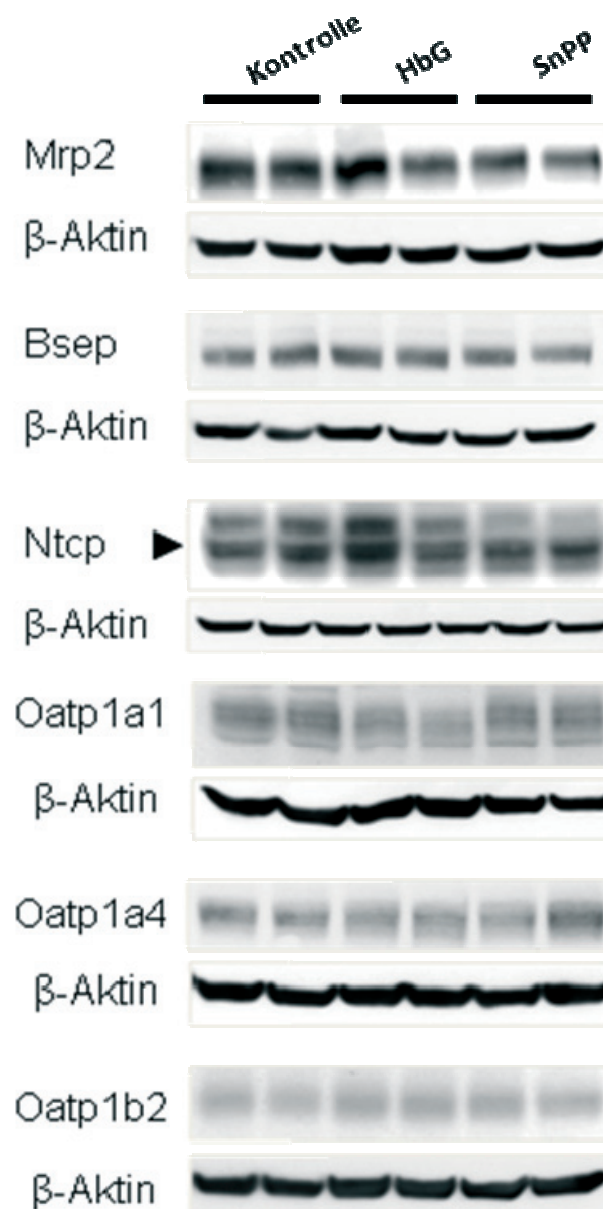


Abb.27: Immunoblot-Analyse von Kontrolltieren nach Präkonditionierung mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX. Die Gesamtmembranfraktionen der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. β -Aktin wurde als Beladungskontrolle eingesetzt. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX.

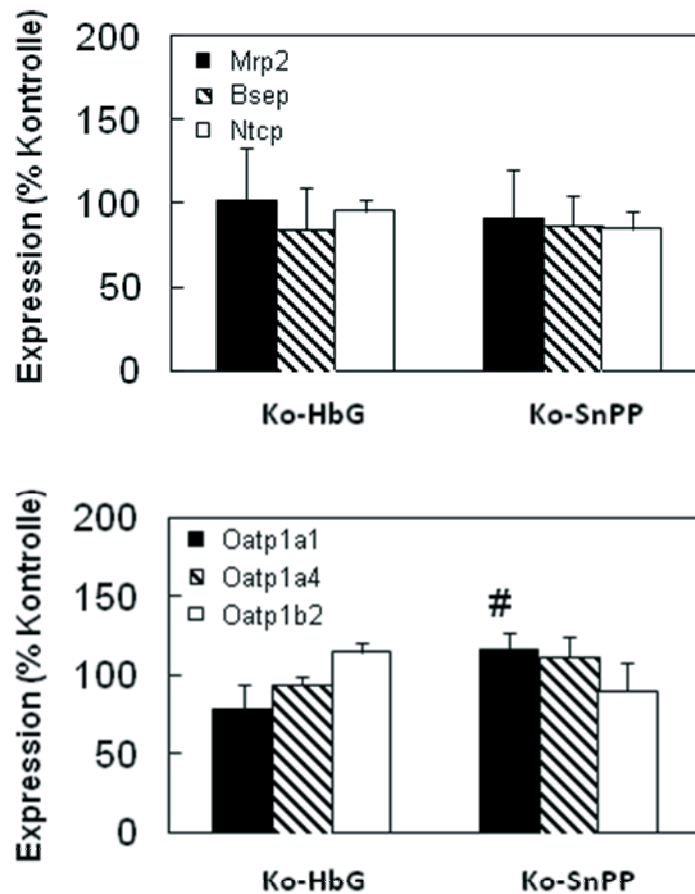


Abb.28: Quantitative Proteinexpression von Kontrolltieren nach Präkonditionierung mit Hämoglobin Glutamer-200 oder SnProtoporphyrin IX. Für die densitometrische Analyse wurden je 4 Tieren pro Versuchsgruppe getestet und mit den Kontrolltieren verglichen. Ko, Kontrolle; IR, Ischämie und Reperfusion; IR+HbG-200, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200; IR+HbG-200+SnPP IX, Ischämie und Reperfusion und Hämoglobin Glutamer-200 und SnProtoporphyrin IX ([#] $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den mit HbG-200 vorbehandelten Versuchstieren).

5 Diskussion

Die Endozytose kanalikulärer Transporter ist ein wichtiger Mechanismus zur Kurzzeitregulation der Gallebildung und wurde in verschiedenen cholestatischen Tiermodellen beschrieben. So konnte nach Gabe von LPS, nach Hyperosmolarität und nach oxidativem Stress eine Transporterinternalisierung von Mrp2 und Bsep an der kanalikulären Membran gezeigt werden (Kubitz et al. 1997, Kubitz et al. 1999, Schmitt et al. 2000, Mühlfeld et al. 2003). Im Tiermodell der kalten Ischämie und Reperfusion wurde gezeigt, dass die Endozytose von Mrp2 einen wichtigen Faktor für den verminderten Gallefluss darstellt (Kudo et al. 2004). Die Transporterinternalisierung konnte nach Hemmung der Kupfferzellaktivierung reduziert werden. Dies lässt vermuten, dass proinflammatorische Zytokine oder reaktive Sauerstoffspezies, die nach Kupfferzellaktivierung freigesetzt werden, die Endozytose von Mrp2 vermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation verschiedener hepatobiliärer Transporter für organische Anionen und Gallensalze im Modell der kalten Ischämie und Reperfusion untersucht. Nach 44 Stunden kalter Ischämie und 3 Stunden Reperfusion konnte eine koordinierte zonierte Internalisierung von Mrp2, Bsep und Ntcp beobachtet werden, die sich vor allem in den Hepatozyten der Zone 3 abspielte. Die Immunfluoreszenzanalyse der verschiedenen Oatp-Isoformen (Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp 1b2) zeige eine vermehrte zytoplasmatische transporterpositive Vesikelbildung in perivenösen Hepatozyten. Das Transportermembransignal der perivenösen Hepatozyten wurde dabei aber nicht signifikant verändert. Das bei Mrp2, Bsep und Ntcp dargestellte Zonierungsmuster wurde zuvor schon für Mrp2 im Modell der experimentellen Sepsis beschrieben (Donner et al. 2004). Dieses Phänomen und die schon beschriebene Kupfferzellaktivierung im Modell der kalten Ischämie und Reperfusion (Kudo et al. 2004) lässt vermuten, dass auch im hier untersuchten Versuchsmodell durch Kupfferzellaktivierung freigesetzte proinflammatorische Zytokine die Internalisierung der verschiedenen Transporter verursachen.

5.1 Mechanismen der Endozytose hepatobiliärer Transporter

In bisherigen Studien zu Mechanismen der Internalisierung kanalikulärer Transporter wurden vor allem die Vorgänge nach oxidativem Stress und bei Östradiol-17 β -D-Glukuronid induzierter Cholestase untersucht. Die Aktivierung der klassischen Proteinkinase C (PKC) wurde dabei als ein wichtiger Faktor identifiziert, der die Endozytose des Gallensalztransporters Bsep vermittelt (Kubitz et al. 2004). Dieser Mechanismus könnte auch bei oxidativem Stress und bei Östradiol induziertem Gallestau gültig sein (Pérez et al. 2006, Boaglio et al. 2010). Die Aktivierung des PI3 Kinase/Akt Signalweges wurde als ein weiterer Mechanismus der Transporterinternalisierung von Bsep bei Östradiol-induzierter Cholestase beschrieben (Boaglio et al. 2010). Die Internalisierung von Mrp2 wird von einer anderen Isoform der Proteinkinase C (nPKC) vermittelt, als nach oxidativem Stress gezeigt wurde (Sekine et al. 2006, 2011). Hierbei wird die Interaktion von Mrp2 mit Radixin reduziert, einem Molekül, dass Mrp2 mit dem Zytoskelett (F-Aktin) verbindet (Sekine et al. 2011). Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ist weiterhin beteiligt an der Internalisierung von Ntcp an der kanalikulären Membran (Stross et al. 2010).

Als ein weiterer wichtiger Mechanismus der Transporterinternalisierung von Mrp2 und Bsep wurde die Aktivierung der src Kinase Fyn beschrieben, die nach oxidativem Stress im Rahmen von Hyperosmolarität aktiviert wird (Cantore et al. 2011). Hierbei könnte die Assoziation mit dem subapikal lokalisierten Protein Cortactin für die Endozytose der kanalikulären Transporter von Bedeutung sein (Cantore et al. 2011). In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass durch die Phosphorylierung des Cortactin das "Cross-Linking" von F-Aktin reduziert wird (Huang et al. 1997). Dies wurde im Rahmen einer früheren Arbeit bereits als möglicher Faktor für die Internalisierung von Bsep beschrieben (Pérez et al. 2006). Zusammenfassend gibt es gute mechanistische Erklärungsansätze, die eine Endozytose von kanalikulären Transportern nach oxidativem Stress belegen. Eine posttranskriptionelle Regulation von Bsep durch Endotoxine wurde ferner in einem humanem Modell an Leberschnitten beschrieben (Elferink et al. 2004). Der genaue Mechanismus einer Transporterinternalisierung durch TNF- α oder IL-1 β ist

jedoch bisher noch unbekannt. Im hier vorliegenden Versuchsmodell könnten sowohl oxidativer Stress als auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine, sowie auch Apoptose, einen auslösenden Mechanismus für die Internalisierung der kanalikulären Transporter Mrp2 und Bsep, als auch des basolateralen Transporters Ntcp darstellen.

5.2 Regulation von Ntcp

Eine weitere mögliche Ursache für die Internalisierung von Ntcp könnte auch eine vermehrte intrahepatische Gallensalzbelastung sein. Ntcp wird sowohl nach experimenteller Gabe von LPS (Gartung et al. 1996) als auch nach experimenteller Exposition mit Gallensalzen herabreguliert (Stanca et al. 2001). Es ist zu vermuten, dass durch die Herabregulation des kanalikulären Gallensalztransporters Bsep in den Hepatozyten der Zone 3 in diesen Zellen auch eine höhere hepatozelluläre Gallensalzkonzentration vorlag, die die Internalisierung von Ntcp ausgelöst haben könnte. Eine kürzlich publizierte Arbeit konnte zeigen, dass Taurin und TCDC eine Endozytose von Ntcp verursachen, die durch Proteinkinase C und Proteinphosphatase 2B (PP2B) vermittelt wird (Mühlfeld et al. 2012). Aufgrund dieser Daten ist zu vermuten, dass eine Endozytose von Ntcp erst erfolgt, wenn eine fast vollständige kanalikuläre Ausscheidung von Gallensalzen wiederhergestellt ist. Zusätzlich könnte das zugegebene Taurocholat im Perfusionsmedium eine persistierende Herabregulation von Ntcp verursacht haben. Weiterhin ist eine Herabregulation von Ntcp durch proinflammatorische Zytokine aus Kupffer-Zellen oder auch durch beginnende Apoptose möglich, da es auch nach LPS-Gabe zu einer ausgeprägten Down-Regulation von Ntcp kommt.

5.3 Zonale Verteilung der Induktion der HO-1

Angesichts der nach Ischämie und Reperfusion freiwerdenden proinflammatorischen Zytokine und reaktiven Sauerstoffspezies erscheint die Reduktion der proinflammatorischen Kupfferzellantwort ein wichtiges

therapeutisches Ziel für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei kalter Ischämie und Reperfusion. Die Induktion der HO-1 konnte durch die Abschwächung der Kupfferzellantwort den hepatozellulären Schaden nach Ischämie und Reperfusion reduzieren (Otterbein et al. 2003, Schmidt et al. 2007, Devey et al. 2009).

Hämoglobin Glutamer-200 wurde in Bezug auf eine Reduktion der Endozytose hepatobiliärer Transporter untersucht, da diese Substanz kürzlich als Induktor der HO-1 identifiziert wurde und nach kalter Ischämie und Reperfusion den hepatozellulären Schaden reduzieren konnte (Topp et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der HO-1 durch HbG-200 insbesondere in den perivenösen Hepatozyten stattfindet. Das Immunfluoreszenzsignal in Kupffer-Zellen war nicht signifikant verändert, sodass die Induktion der HO-1 durch HbG-200 in erster Linie in Hepatozyten stattfindet. Die Induktion betrifft folglich die Hepatozytenpopulation, in der die Herabregulation von Mrp2, Bsep und Ntcp beschrieben wurde.

Die Präinduktion der HO-1 führte nach kalter Ischämie und Reperfusion zu einer weitgehenden Wiederherstellung des Membransignals von Mrp2 und Bsep in der kanalikulären Membran von Hepatozyten der Zone 3. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung von HO-1 die Rücknahme dieser Transporter aus der kanalikulären Membran hemmt.

5.4 Induktion der HO-1 als therapeutische Strategie zur Verbesserung der hepatobiliären Funktion nach kalter Ischämie und Reperfusion

Angesichts der primär hepatozellulär stattfindenden Induktion der HO-1 wird vermutet, dass die Induktion der HO-1 mit Signalwegen interferiert, die eine Rücknahme von Membrantransportern aus der kanalikulären Membran vermitteln. Die Stimulation der HO-1 an Kontrolltieren zeigte, dass die Produkte der HO-1 keinen direkten Einfluss auf die Transporterexpression und Lokalisation nehmen. Vielmehr scheinen nach Induktion der HO-1 Signalwege moduliert zu werden, die nur in cholestatischen Lebern aktivierbar sind. Ein möglicher Mechanismus ist hierbei die Interferenz mit dem TNF- α -Signalweg. Die Induktion der JNK wurde

nach warmer Ischämie und Reperfusion beschrieben (Bendinelli et al. 1996, Bradham et al. 1997, Yoshinari et al. 2001) und als Signalweg für die Vermittlung von hepatozellulärer Nekrose und Apoptose analysiert (Crenesse et al. 2001, Uehara et al. 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass die HO-1 den oxidativen Stress nach Ischämie und Reperfusion reduziert (Yun et al. 2010). Die antioxidativen Eigenschaften der HO-1 könnten durch die Elimination von prooxidativem Häm oder durch die Produkte Biliverdin/Bilirubin und CO, als potente Antioxidantien, vermittelt werden (Stocker et al. 1987, Baranano et al. 2002, Wang et al. 2007). Eine Behandlung mit Biliverdin konnten den Leberschaden nach Ischämie und Reperfusion über eine verminderte Aktivierung des JNK / AP-1 Signalwegs nach experimenteller Lebertransplantation reduzieren (Tang et al. 2007). CO könnte andererseits mit dem NFκB Signalweg interferieren. Der TNF-α vermittelte Zelltod konnte durch die Präinduktion von CO reduziert werden (Zuckerbraun et al. 2003) und wurde über eine Aktivierung von NFκB vermittelt. NFκB aktiviert das Signalmolekül Gadd45β, dass die JNK Aktivierung über eine Blockade von MKK7 in einem Modell der Leberregeneration hemmt (Papa et al. 2008). Die Aktivierung von JNK konnte durch eine Präinduktion mit CO in einem Lebertransplantationsmodell jedoch nicht verhindert werden (Kaizu et al. 2008), sodass dieser Mechanismus möglicherweise nicht für den hier beschriebenen Effekt verantwortlich ist. Es wird daher angenommen, dass Biliverdin als Produkt der Induktion der HO-1 die beschriebenen protektiven Effekte über eine Abschwächung in der hepatozellulären Zytokin- oder ROS-Antwort vermitteln könnte.

Ein weiterer Mechanismus der reduzierten Endozytose von Mrp2 und Bsep nach HO-1 Induktion könnte über eine Interferenz mit der Aktivierung von Fyn zustande kommen. Es ist anzunehmen, dass der im Rahmen von Ischämie und Reperfusion auftretende oxidative Stress diese Isoform der Tyrosinkinase Src (Src Kinasen) aktiviert. Eine Induktion der HO-1 könnte über eine reduzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies die Aktivierung von Fyn und damit den Ausbau von Mrp2 und Bsep aus der kanalikulären Membran hemmen.

5.5 Mögliche Ursachen der fehlenden Regulation von Ntcp nach HO-1 Induktion

Die Regulation von Ntcp im Bereich der perivenösen Hepatozyten wird durch die Induktion der HO-1 nicht verändert. Angesichts der reduzierten Expression von Bsep in dieser Hepatozytenpopulation wird angenommen, dass intrazellulär eine persistierend erhöhte Konzentration von Gallensalzen vorlag. Dies könnte die persistierende reduzierte Membranexpression von Ntcp erklären und durch eine Aktivierung von Proteinkinase C und Proteinphosphatase N2 β vermittelt werden (Mühlfeld et al. 2012). Ferner ist anzunehmen, dass eine erhöhte intrazelluläre Gallensalzkonzentration zu einer persistierenden Aktivierung des FXR führt und somit die transkriptionelle Aktivierung des Ntcp-Promotors unterdrückt (Geier et al. 2005). Analog zum aktuell untersuchten Modell wird auch im Modell der obstruktiven Cholestase nach Blockade von TNF- α und IL-1 β die posttranskriptionelle Herabregulation von Ntcp (Geier et al. 2005) oder die zonale Regulation durch Endozytose nicht aufgehoben (Donner et al. 2007). Vermutlich unterhalten hohe Gallensalzkonzentrationen die Herabregulation von Ntcp in verschiedenen Cholestasemodellen, auch wenn der initiale Stimulus pharmakologisch moduliert wurde.

5.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine koordinierte zonale Herabregulation der kanalikulären Transporter Mrp2 und Bsep sowie des basolateralen Gallensalzaufnahmetransporters Ntcp gezeigt werden. Aufgrund der in anderen Arbeiten nach kalter Ischämie und Reperfusion beschriebenen Kupfferzellaktivierung und den bisher bekannten Mechanismen zur Regulation hepatobiliärer Transporter wird vermutet, dass entweder die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β oder reaktive Sauerstoffspezies die Endozytose von Mrp2, Bsep und Ntcp vermitteln, oder aber auch Apoptosemechanismen die Ergebnisse erklären könnten. Die Induktion der HO-1 konnte die Expression von Mrp2 und Bsep in perivenösen Hepatozyten weitgehend wiederherstellen.

Vermutlich kann die Induktion der HO-1 über ihre Spaltprodukte Biliverdin oder CO mit hepatozellulären Signalwegen proinflammatorische Zytokine oder ROS interferieren und damit die Signale für eine Endozytose von Mrp2 und Bsep aus der kanalikulären Membran abschwächen.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Regulation hepatobiliärer Transporter nach kalter Ischämie und Reperfusion können das Verständnis für die Pathogenese der Cholestase nach Lebertransplantation erweitern. Die Induktion der HO-1 könnte ihre Effekte auf die Expression kanalikulärer Transporter über eine Reduktion der hepatozellulären Signalantwort auf TNF- α , IL-1 β , ROS oder Apoptose vermitteln und könnte so eine neue therapeutische Strategie für die Behandlung und Prävention eines cholestatischen Leberschadens nach Lebertransplantation darstellen.

6 Zusammenfassung

Nach Lebertransplantationen kommt es bei einem Viertel der Patienten zu einer anhaltenden Cholestase, die mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Molekulare Mechanismen der Cholestase nach kalter Ischämie und Reperfusion sind weitgehend unbekannt und therapeutische Strategien bisher nicht etabliert. Zukünftige therapeutische Maßnahmen zur Verminderung der Cholestase nach Ischämie und Reperfusion sollten die Wiederherstellung der Lokalisation und Expression der hepatobiliären Transporter erzielen und dadurch die biliäre Ausscheidung von cholephilen Substanzen verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die zonale Expression und die Proteinexpression von Mrp2, Bsep, Ntcp und drei Isoformen der Oatp-Familie nach kalter Ischämie und Reperfusion, sowie nach Induktion der Hämoxxygenase-1 untersucht. Die kanalikulären Transporter Mrp2 und Bsep zeigten nach kalter Ischämie und Reperfusion eine signifikante Herabregulation in perivenösen Hepatozyten. Die Induktion der Hämoxxygenase-1 durch Hämoglobin Glutamer-200 verbesserte die Transporterexpression von Mrp2 und Bsep vor allem in den perivenösen Hepatozyten. Die Transporterexpression von Ntcp wurde nach kalter Ischämie und Reperfusion signifikant in Hepatozyten der Zone 3 reduziert. Die Induktion der Hämoxxygenase-1 hatte jedoch keinen Effekt auf die Expression von Ntcp. Die zonale Transporterexpression von Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 in den periportalen Hepatozyten war sowohl nach Ischämie und Reperfusion als auch durch die Induktion der Hämoxxygenase-1 im Vergleich zu den Kontrollen unverändert. Die Induktion der HO-1 durch HbG-200 erfolgte vornehmlich in Hepatozyten der Zone 3. Zusammenfassend kann die Herabregulation von Mrp2 und Bsep in perivenösen Hepatozyten durch die Induktion der Hämoxxygenase-1 deutlich gehemmt werden. Vermutlich moduliert die HO-1 hepatozelluläre Signalwege, die eine Endozytose von kanalikulären Transporten bewirken. Somit könnte die HO-1 ein Zielmolekül für zukünftige Therapien zur Reduktion des cholestatischen Leberschadens nach Lebertransplantation sein.

7 Summary

Following liver transplantation, 25% of patients develop persistent cholestasis, which is associated with a significant mortality. Molecular mechanism of cholestasis following cold ischemia and reperfusion are largely unknown and therapeutic strategies are not established. Future therapeutic measures to alleviate cholestasis following ischemia and reperfusion shall aim at reconstitute localization and expression of hepatobiliary transporters and shall improve biliary secretion of cholephilic substances. In the present work zonal expression and protein expression of Mrp2, Bsep, Ntcp and three isoforms of the Oatp family was investigated following cold ischemia and reperfusion and well as after induction of heme oxygenase-1. Canalicular transporters Mrp2 and Bsep showed significant down-regulation in perivenous hepatocytes following cold ischemia and reperfusion. Induction of HO-1 by hemoglobin glutamer-200 improved Mrp2 and Bsep expression, predominantly in perivenous hepatocytes. Expression of Ntcp was significantly reduced in perivenous hepatocytes following cold ischemia and reperfusion. Induction of HO-1 had no effect on the expression of Ntcp. Zonal expression of Oatp1a1, Oatp 1a4, Oatp 1b2 following ischemia reperfusion and following HO-1 induction was unchanged. Induction of HO-1 due to HbG-200 predominantly occurred in zone 3 hepatocytes. In summary, down-regulation of Mrp2 and Bsep in perivenous hepatocytes following ischemia and reperfusion can be largely inhibited by inducing HO-1. It is suggested that HO-1 modulates hepatocellular signaling pathways that may interfere with endocytosis of canalicular transporters. Thus, HO-1 could be a target molecule for future therapeutic strategies to reduce the extent of cholestatic liver injury following liver transplantation.

8 Literaturverzeichnis

Abe T., Kakyo M., Tokui T., Nakagomi R., Nishio T., Nakai D., Nomura H., Unno M., Suzuki M., Naitoh T., Matsuno S., Yawo H., (1999).

Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* **274**, 17159-17163.

Abe T., Unno M., Onogawa T., Tokui T., Kondo T.N., Nakagomi R., Adachi H., Fujiwara K., Okabe M., Suzuki T., Nunoki K., Sato E., Kakyo M., Nishio T., Sugita J., Asano N, Tanemoto M., Seki M., Date F., Ono K. et al. (2001).

LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* **120**, 1689-1699.

Accatino L., Pizarro M., Solís N., Arrese M., Koenig C.S. (2003).

Bile secretory function after warm hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Liver Transpl* **9**, 1199-1210.

Alberti K.G.M, Taylor R., Johnson D.G. (1992).

Carbohydrate metabolism in liver disease. In: Millward-Sadler G.H., Wright R., Arthur M.J.P., eds. *Wright's Liver and biliary disease*. London: WB Saunders, pp 43-66.

Ananthanarayanan M., Balasubramanian N., Makishima M et al. (2001).

Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* **276**, 28857-28865.

Angeletti R.H., Novikoff P.M., Javadi S.R., Fritschy J.M., Meier P.J., Wolkoff A.W. (1997).

The choroid plexus epithelium is the site of the organic transport protein in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 283-286.

Answer M.S. (1993).

Transhepatic solute transport and bile formation. *Adv Vet Sci Comp Med* **37**, 1-19.

Answer M.S. (1998).

Cellular and molecular biology of the liver. *Curr Opin Gastroenterol* **14**, 182-190.

Arrese M., Trauner M., Ananthanarayanan M., Pizarro M., Solis N., Accatino L., Soroca C., et al. (2003).

Down-regulation of the Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide during pregnancy in the rat. *J Hepatol* **38**, 148-155.

Badger I.L., Michell I.D., Buist L.J., Sherlock D., Buckels J.A.C., Mc Master P. (1990).

Human hepatic preservation using Marshall's solution and University of Wisconsin solution in a controlled, prospective trial. *Transpl Proc* **22**, 2183-2184.

Ban D., Kudo A., Sui S., Tanaka S., Nakamura N., Ito K., Suematsu M., Arii S. (2008).

Decreased Mrp2-dependent bile flow in the post-warm ischemic rat liver. *J Surg Res* **153**, 310-316.

Baranamo D.E., Rao M., Ferris C.D., Snyder S.H. (2002).

Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16093-16098.

Beassier M., Wendum D., Fouassier L., Rey C., Barbu V., Lasnier E., Lienhart A., Scoazec J.Y., Rosmorduc O., Housset C. (2005).

Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol* **42**, 257-65.

Beierle E.A., Vauthey J.N., Moldawer L.L., 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.

Bell R., Making G., Robbins P., Robertson T., House A.K. (1997).

Hypothermic ischaemia of the liver: A re-perfusion phenomenon. *Aust NZ J Surg* **67**, 442-447.

Belzer F.O., Southard J.H. (1988).

Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* **45**, 673-676.

Bendinelli P., Piccoletti R., Maroni P., Bernelli-Zazzera A. (1996).

The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver perfusion. *FEBS Lett.* **398**, 193-197.

Beresford W.A., Henninger J.M. (1986).

A tabular comparative histology of the liver. *Arch Histol Jpn* **49**, 267-281.

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., 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.

Boaglio A.C., Zucchetti A.E., Sánchez Pozzi E.J., Pellegrino J.M., Ochoa J.E., Mottino A.D., Vore M., Crocenzi F.A., Roma M.G. (2010).

Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase b signaling pathway is involved in estradiol 17 β -D-glucuronide-induced cholestasis: complementary with classical protein kinase c. *Hepatology* **52**, 1465-1476.

Boyer J. (2007).

New perspectives for the treatment of cholestasis (lessons from basic science applied clinically). *J Hepatol* **46**, 365-371.

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.

Bradham C.A., Stachlewitz R.F., Gao W., Qian T., Jayadev S., Jenkins G., Hannun Y., Lemasters J.J., Thurman R.G., Brenner D.A. (1997).

Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinase. *Hepatology* **25**, 1128-1135.

Brass C.A., Roberts T.G. (1995).

Hepatic free radical production after cold storage: Kupffer cell-dependent and independent mechanisms in rats. *Gastroenterology* **108**, 1167-1175.

Bretschneider M.J. (1980).

Myocardial protection. *Thorac cardiovasc Surg* **28**, 295-302.

Brink J.G., Cooper D.K. (2005).

Heart transplantation: the contributions of Christiaan Bernard and the University of Cape Town/Groote Schuur Hospital. *World J Surg* **29**, 953-961.

Bronfenmajer S., Schaffner F., Popper H. (1966).

Fat-storing cells, interstitial cells (lipocytes) in human liver. *Arch Pathol Lab Med* **82**, 447-453.

Cantore M., Reinehr R., Sommerfeld A., Becker M., Häussinger D. (2011).

The Src family kinase Fyn mediates hyperosmolarity-induced Mrp2 and Bsep retrieval from canalicular membrane. *J. Biol. Chem.* **286**, 45014-45029.

Carrel A., Guthrie C.C. (1906).

Successful transplantation of both kidneys from a dog into a bith with removal of both normal kidneys from the latter. *Science* **23**, 394-395.

Chang R.W.H., Quan S.S., Yen W.W.C. (1989).

An applied anatomic study of the ostia venae hepaticae and the retrohepatic segment of the inferior vena cava. *J Anat* **164**, 41-48.

Chiang J.Y. (2003).

Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **284**, G349-G356.

Christensen H.N. (1982).

Interorgan amino acid nutrition. *Physiol Rev* **62**, 1193-1233.

Cisneros C., Guillén F., Gomez R., Gutierrez J., Vorwald P., Montero A., Moreno E. (1991).

Analysis of warm ischemia time for prediction of primary nonfunction of the hepatic graft. *Transplant Proc* **23**, 1976.

Cohn M.A., Rounds D.J., Karpen S.J., Ananthanarayanan M., Suchy F.J. (1995).

Assignment of a rat liver Na⁺/bile acid cotransporter gene to chromosome 6q24. *Mamm Genome* **6**:60

Correia M.A., Castagnoli N. (1987).

Pharmacokinetics: II. Drug Biotransformation. In: Katzung B.G., ed. *Basic and clinical pharmacology*, 3rd edn. Norwalk: Appleton and Lange, pp 36-43.

Couinaud C. (1957).

Le foie; études anatomiques et chirurgicales. Paris: Masson et Cie, 1957.

Crenesse D., Laurens M., Gugenheim J., Heurteaux C., Cursio R., Rossi B., Schmid-Alliana A. (2001).

Intermittent ischemia reduces warm hypoxia-reoxygenation-induced JNK(1)/SAPK(1) activation and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* **34**, 972-978.

Cui Y., König J., Keppler D. (2001).

Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2. *Mol Pharmacol* **60**, 934-943.

Dahme E., Weiss E., (1999).

Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, Enke Verlag, 5. Auflage.

Delis S.G., Bakoyannis A., Selvaggi G., Weppler D., Levi D., Tzakis A.G. (2009).

Liver transplantation for severe hepatic trauma: experience from a single center. *World J Gastroenterol* **15**, 1641-1644.

Desmet V.J., Roskams T., De Vos R. (1997).

Normal Anatomy in Gallbladder and Bile Ducts. In: La Russo N, ed. Vol. 6 of the series Gastroenterology and Hepatology: The comprehensive visual reference current medicine. Philadelphia pp 1-29.

Devey L., Ferenbach D., Mohr E., Sangster K., Bellamy C.O., Hughes J., Wigmore S.J. (2009).

Tissue-resident macrophages protect the liver from ischemia reperfusion injury via heme oxygenase-1-dependent mechanism. *Mol Ther* **17**, 65-72.

Döring B., Lütteke T., Geyer J., Petzinger E. (2012)

The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr* **70**, 105-168.

Donner M., Keppler D. (2001).

Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* **34**, 351-359.

Donner M., Warskulat U., Saha N., Häussinger D. (2004).

Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS. *Biol Chem* **385**, 331-339.

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

Obstruktive cholestasis induces TNF- α and IL-1 β -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4 and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G1134-G1146.

Drummond G.S., Kappas A. (1981).

Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin SnProtoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol **78**, No 10, 6466-6470.

Elferink M.G.L., Olinga P., Draaisma A.L., Marema M.T., Faber K.N., Slooff M.J.H., Meijer D.K.F., Groothuis G.M.M. (2004).

LPS-induced down regulation of Mrp 2 and Bsep in human liver is due to a posttranscriptional process. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, 1008-16.

Erhard J., Lange R., Scherer R., Eigler F.W. (1993).

Experiences with histidine-tryptophan-ketoglutarate-perfused organs in clinical liver transplantation. *Transpl Proc* **25**, 1885-1886.

European medicines agency, science medicines health (2012).

www.ema.europa.eu

http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000045/WC500068122.pdf

Felig P. (1975).

Amino acid metabolism in man. *Annu Rev Biochem* **44**, 933-955.

Fouassier L., Beaussier M., Schiffer E., Rey C., Barbu V., Mergey M., Wendum D., Callard P., Scoazec J.Y., Lasnier E., Sieger B., Lienhart A., Housset C. (2007).

Hypoxia-induced changes in the expression of rat hepatobiliary transporter genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G25-35.

Fromm M.F. (2003).

Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur J Clin Invest* **33**, 6-9.

Fusai G., Dhaliwal P., Rolando N., Sabin C.A., Patch D., Davidson B.R., Burroughs A.K., Rolles K. (2006).

Incidence and risk factors for the development of prolonged and severe intrahepatic cholestasis after liver transplantation. *Liver Transpl* **12**, 1626-1633.

Galbraith R.A., Drummond G.S., Kappas A. (1985).

Sn-Protoporphyrin suppresses chemically induced experimental hepatic porphyria. *J Clin Invest* **76**, 2436-2439.

Gao B., Stieger B., Noé B., Fritschy J.M., Meier P.J. (1999).

Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp 2) 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.J., Stolz A., Suchy F.J., Boyer J.L. (1996).

Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **110**, 199-209.

Gebhardt R., Mecke D. (1983).

Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO* **2**, 567-570.

Geier A., Dietrich C., Voigt S., Kim S., Gerloff T., Kullak-Ublick G., Lorenzen J., Matern S., Gartung C. (2003).

Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* **38**, 345-354.

Geier A., Zollner G., Dietrich C.G., Wagner M., Fickert P., Denk H., Van Rooijen N., Matern S., Gartung C., Trauner M. (2005).

Cytokine-independent repression of rodent Ntcp in obstructive cholestasis. *Hepatology* **41**, 470-477.

Geier A., Dietrich C.G., Trauner M., Gartung C. (2007).

Extrahepatic cholestasis downregulates Oatp1 by TNF- α signalling without affecting Oatp2 and Oatp4 expression and sodium-independent bile salt uptake in rat liver. *Liver Int* **27**, 1056-1065.

Geier A., Wagner M., Dietrich C.G., Trauner M. (2007).

Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 283-308.

Grisham J.W., Napanitaya W., Compagno J. (1976).

Scanning electron microscopy of the liver: a review of methods and results. In: Popper H., Schaffner F., eds. *Progress in liver disease*, vol. V. New York: Grune & Stratton pp 1-23.

Gruttadauria S. (2009).

Pediatric liver transplantation. *World J Gastroenterol* **15**, 648-674.

Gubernatis G., Dietl K.H., Kemnitz J., Oldhafer K., Hauss J., Buchholz B., Pichlmayr R. (1991).

Extended cold preservation time (20 hours 20 minutes) of a human liver graft by using cardioplegic HTK solutions. *Transplant Proc* **23**, 2408-2409.

Gumucio J.J., Miller D.L. (1982).

Zonal hepatic function: solute-hepatocyte interactions within the liver acinus. In Popper H, Schaffner F, eds. *Progress in liver disease*, vol. VII. New York: Grune & Stratton, 17-30.

Gupta S.C., Gupta C.D., Arora A.K. (1977).

Subsegmentation of the human liver. *J Anat* **124**, 413-423.

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**, 269-284.

Häussinger D., Sies H., 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 W.H., Moormann A.F. (1992).

Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* **46**, 72-93.

Häussinger D., Lamers W.H., Moormann A.F.M. (1993).

Metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* **46**, 72-93.

Hagenbuch B., Dawson P. (2004).

The sodium bile salt cotransport family SLC 10. *Pflugers Arch* **447**, 566-570.

Hagenbuch B., Gui C. (2008).

Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* **38**, 778-801.

Hagenbuch B., Meier P.J. (1994).

Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* **93**, 1326-1331.

Hagenbuch B., Meier P.J. (2003).

The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 1-18.

Hagenbuch B., Reichel C., Stieger B., Cattori V., Fattinger K.E., Landmann L., Meier P.J., 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.

Haga Y., Sakamoto K., Egami H., Yokoyama Y., Arai M., Mori K., 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**, 842-8.

Hardy J.D., Webb W.R., Dalton M.L. Jr, Walker G.R. Jr. (1963).

Lung homotransplantation in man. Report of initial case. *JAMA* **186**, 1065-1074.

Hardy J.D., Chavez C.M., Kurrus F.D. (1964).

Heart transplantation in man. Developmental studies and report of a cases.
JAMA **188**, 1132-1140.

Harvey P.R., Iu S., Mc Keown C.M.B., Petrunka C.N., Ilson R.G., Strasberg S.M. (1988).

Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. Transplantation **45**, 1016-1020.

Hoekstra H., Tian Y., Jochum W., Stieger B., Graf R., Porte R.J., Clavien P.A. (2008).

Dearterialization of the liver causes intrahepatic cholestasis due to reduced bile transporter expression. Transplantation **85**, 1159-1166.

Holloway C.M.B., Harvey P.R.C., Strasberg S.M. (1990).

Viability of sinusoidal lining cells in cold preservation rat liver allograft.
Transplantation **49**, 225-228.

Howard T.K., Klintmalm C.B.G., Cover J.B., Husberg B.S., Goldstein R.M., Gonwa T.A. (1990).

The influence of preservation injury on rejection in hepatic transplant recipients. Transplantation **49**, 103-107.

Huang C., Ni Y., Wang T., Gao Y., Haudenschild C.C., Zhan X. (1997).

Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem. **272**, 13911-13915.

Hjortso C.H. (1951).

The topography of the intrahepatic duct system. Acta Anat **11**, 599-615.

Isai H., Sheil A.G.R., Bell R., Woodman K., Painter D.M., Earl J., Kirwan P.D., Liu W.G. (1990).

A comparison of the UW solution with and without hydroxyethyl starch for liver preservation using the isolated porcine liver perfusion model. Transplant Proc **22**, 2152-2153.

Ito T. (1951).

Cytological studies on stellate cells of Kupffer and fat-storing cells in the capillary wall of the human liver. Acta Anat Nippon **26**, 2-42.

Jacquemin E., Hagenbuch B., Stieger B., Wolkoff A.W., Meier P.J. (1994).

Expression cloning of a rat liver Na⁺-independent organic anion transporter. Proc Natl Acad Sci USA **91**, 133-137.

Jaeschke H., Farhood A. (1991).

Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. Am J Physiol **260**, G 355-362.

James L., Boyer M.D. (2007).

New perspectives for the treatment of cholestasis (Lessons from basic science applied clinically). J Hepatol **46**, 365-371.

Jamieson N.V., Sundberg R., Lindell S., Claesson K., Moen J., Vreugdenhill P.K., Wight D.G.D., Southard J.H., Belzer F.O. (1988a).

Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solutions. Transplantation **46**, 517-522.

Jedlitschky G., Hoffmann U., Kroemer H.K. (2006)

Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. Expert Opin Drug Metab Toxicol **2**, 351-366.

Jungermann K. (1988).

Metabolic zonation of liver parenchyma. Semin Liver Dis **8**, 329-341.

Jungermann K., Katz N. (1989).

Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* **69**, 708-764.

Kaizu T., Ikeda A., Nakao A., Tsung A., Toyokawa H., Ueki S., Geller D.A., Murase N. (2008).

Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G236-G244.

Kalayoglu M., Stratta R.J., Hoffmann R.M., Sollinger H.W., D' Alessandro A.M., Pirsch J.D., Belzer F.O. (1988).

Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* **1**, 617-619.

Kamiike W., Burdelski M., Steinhoff G., Ringe B., Lauchart W.E., Pichlmayr R. (1988).

Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation* **45**, 138-143.

Kappas A., Simionatto C.S., Drummond G.S., Sassa S., Anderson K.E. (1985).

The liver secretes large amounts of heme into bile when heme oxygenase is inhibited competitively by Sn-protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci* **82** 896-900.

Karpen S.J. (2002).

Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* **36**, 832-850.

Kast H.R., Goodwin B., Tarr P.T. (2008).

Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **277**, 2908-2915.

Keitel V., Kubitz R., Häussinger D. (2008).

Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* **14**, 5620-5629.

Kiernan F. (1833).

The anatomy and physiology of the liver. *Philos Trans R Soc Lond* **123**, 711-770.

Kim S.J., Park J.G., Lee S.M. (2012).

Protective effect of heme oxygenase-1 induction against hepatic injury in alcoholic steatotic liver exposed to cold ischemia/reperfusion. *Life Sci* **90**, 169-176.

König J., Nies A.T., Cui Y., Leier I., Keppler D. (1999).

Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 377-394.

König J., Cui Y., Nies A.T. Keppler D. (2000a).

Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* **275**, 23161-2318.

König J., Seithel A., Gradhand U., Fromm M.F. (2006).

Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **372**, 432-443.

Kubitz R., D'urso D., Keppler D., Häussinger D. (1997).

Osmodependent dynamic localization of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* **113**, 1438-1442.

Kubitz R., Wettstein M., Warskulat, Häussinger D. (1999).

Regulation of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* **116**, 401-410.

Kubitz R., Saha N., Kühlkamp T., Dutta S., vom Dahl S., Wettstein M., Häussinger D. (2004).

Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* **279**, 10323-10330.

Kubulus D., Rensing H., Paxian M., Thierbach J.T., Meisel T., Redl H., Bauer M., Bauer I. (2005).

Influence of heme-based solutions on stress protein expression and organ failure after hemorrhagic shock. *Crit Care Med* **33**, 629-637.

Kudo A., Kashiwagi S., Kajimura M., Yoshimura Y., Uchida K., Arii S., Suematsu M. (2004).

Kupffer cells alter organic anion transporter through Multidrug Resistance-Associated Protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology* **39**, 1099-1109.

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., Meier P.J. (2004).

Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**, 322-342.

Kumamoto Y., Suematsu M., Shimazu M., Kato Y., Sano T., Makino N., Hirano K.I., Naito M., Wakabayashi G., Ishimura Y., Kitajima M. (1999).

Kupffer cell-independent acute hepatocellular oxidative stress and decreased bile formation in post-cold-ischemic rat liver. *Hepatology* **30**, 1454-1463.

Laemmli U.K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lam P., Ph.D., Soroka C.J., Ph.D., Boyer J.L., M.D. (2010).

The bile salt export pump: Clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis* **30**, 125-133.

Lamesch P., Raygrotzki S., Kehren G., Gubernatis G., Bretschneider H.J., Pichlmayr R. (1990).

Preservation of the liver with the HTK solution. *Transplant Proc* **22**, 518-519.

Lanevski A., Wardrop K. (2001).

Principles of transfusion medicine in small animals. *Can Vet J* **42**, 447-454.

Lazarow P.B. (1978).

Rat liver peroxisomes catalyze the β -oxidation of fatty acids. *J Biol Chem* **277**, 1522-1528.

Lee H.B., Blafox M.D. (1985).

Blood volume in the rat. *J Nucl Med* **26**, 72-76.

Lee J., Azzaroli F., Wang L., Soroka C.J., Gigliozi A., Setchell K.D., Kramer W., Boyer J.L. (2001).

Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **121**, 1473-1484.

Lee J.M., Stieger B., Soroka C.J. S, Meier P.J. Boyer J.L. (2000).

Expression of bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **118**, 163-172.

Lee J.M., Trauner M., Soroka C.J., Stieger B., Meier P.J., Boyer J.L. (2000).

Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **118**, 163-172.

Letschert K., Keppler D., König J. (2004).

Mutation in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP 8). *Pharmacogenetics* **14**, 441-452.

Li L., Lee T.K., Meier P.J., Ballatori N. (1998).

Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C₄ as a substrate for Oatp 1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* **273**, 16184-16191.

Li L., Meier P.J., Ballatori N. (2000).

Oatp 2 mediates bidirectional organic solute transport: A role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* **58**, 335-340.

Liebich H.G. (1999).

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Schattauer Verlag, 3. Auflage.

Lumsden A., Henderson J., Kutner M. (1988).

Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* **8**, 232-236.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2003).

Brock Mikrobiologie, Spektrum Verlag, 2. korrigierter Nachdruck.

Mac Phee P.J., Schmidt E.E, Groom A.C. (1992).

Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* **263**, G17-G23.

Mac Swen R.N.M., Desmet V.J., Roskams T. et al. (2002).

Developmental anatomy and normal structure. In: Mac Sween R.N.M., Burt A.D., Portmann B.C., et al., eds. Pathology of the liver. 4th edn. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1-66.

Mak K.M., Lieber C.S. (1984).

Alterations in endothelial fenestration liver sinusoids of baboons fed alcohol. A scanning electron microscopic study. Hepatology **4**, 386-391.

Marchioro T.L., Huntley R.T., Waddell W.R., Starzl T.E. (1963).

Extracorporeal perfusion for obtaining postmortem homografts. Surgery **54**, 900-911.

Mareninova O., Shin J.M., Vagin O., Turdikulova S., Hallen S., Sachs G. (2005).

Topography of the membrane domain of the liver Na⁺-dependent bile acid transporter. Biochemistry **44**, 13702-13712.

Martin D.R., Scott D.F., Downes G.L., Belzer F.O. (1972).

Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: Cold sensitivity of the ATPase system. Ann Surg **175**, 111-117.

Mc Cuskey R.S. (2000).

Morphological mechanism for regulating blood flow through hepatic sinusoids. **20**, 3-7.

Mc Guire R.F., Bissell D.M., Boyles J., Roll F.J. (1992).

Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of endothelial cells isolates from normal liver. Hepatology **15**, 989-997.

McKeown C.M.B., Edwards V., Phillips M.J., Harvey P.R.C., Petrunka C.N., Strasberg S.M. (1988).

Sinusoidal lining cell damage: The critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* **46**, 178-191.

Mears D.C., Sheil A.R.G., Kelly G.E., Dilworth P., Ishikawa T. (1992).

A comparison of University of Wisconsin and albumin solution for donor liver preservation. *Transplant Proc* **24**, 260-262.

Meier P.J. (1988).

Transporter polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis* **8**, 293-307.

Meier P.J., Eckhardt U., Schroeder A., Hagenbuch B., 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., Stieger B. (2000).

Molekular mechanisms in bile formation. *News Physiol Sci* **15**, 89-93.

Meyer zu Schwabedissen H.E., Tirona R.G., Yip C.S. et al (2008).

Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 9338-9347.

Miller L.L., Bly C.G., Watson M.L., et al. (1951).

The dominant role of the liver in plasma protein synthesis: a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *J Exp Med* **94**, 431-453.

Monte M.J., Marin J., Antelo A., Vazquez-Tato J. (2009).

Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* **15**, 804-816.

Motta P.M. (1975).

A scanning electron microscopic study of the rat liver sinusoid. *Cell Tissue Res* **164**, 371-385.

Motta P., Porter K. (1974).

Structure of rat liver sinusoids and associated tissue spaces as revealed by scanning elektron microscopy. *Cell Tissue Res* **148**, 111-125.

Mühlfeld A., Kubitz R., Dransfeld O., Häussinger D., Wettstein M. (2003).

Taurine supplementation induces Multidrug Resistance-Associated Protein 2 and bile salt export pump expression in rats and prevents endotoxin-induced cholestasis. *Arch Biochem Biophys* **413**, 32-40.

Mühlfeld S., Domanova O., Berlage T., Stross C., Helmer A., Keitel V., Häussinger D., Kubitz R. (2012).

Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rat liver. *Hepatology* **56**, 2387-2397.

Nathanson M.H., Boyer J.L. (1991).

Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* **14**, 551-566.

Niemi M. (2007).

Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* **8**, 787-802.

Otterbein L.E., Soares M.P. Yamashita K., Bach F.H. (2003).

Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* **24**, 449-455.

Pannen B. H-J., Köhler N., Hole B., Bauer M., Clemens M.G., Geiger K.K. (1998).

Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* **102**, 1220-1228.

Paulusma C.C., Kothe M.j.C., Bakker C.T.M., Bosma P., van Bokhoven I., van Marle J., Bolder U., Tytgat G.N., Oude Elferink R.P. (2000).

Zonal down-regulation and redistribution of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* **31**, 684-693.

Papa S., Zazzeroni F., Fu Y.X., Bubici C., Alvarez K., Dean K., Christiansen P.A., Andres R.A., Franzoso G. (2008).

Gadd45beta promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling. *J Clin Invest* **118**, 1911-1923.

Pérez L.M., Milkiewicz P., Ahmed-Choudhury J., Elias E., Ochoa J.E., Sánchez Pozzi E.J., Coleman R., Roma M.G. (2006).

Oxidative stress induces actin-cytoskeletal and tight-junctional alterations in hepatocytes by Ca^{2+} -dependent. PKC-mediated mechanism: protective effect of PKA. *Free Radic Biol Med* **40**, 2005-2017.

Perwaiz S., Tuchweber B., Mignault D., Gilat T., Yousef I.M. (2001).

Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* **42**, 114-119.

Philips M.J., Satir P. (1988).

The cytoskeleton of the hepatocyte: organisation, relationships and pathology. In: Arias I.M., Jakoby W.B., Popper H., Schachter D., Shafritz D.A., eds. *The liver: biology and pathobiology*. New York: Raven Press, pp 11-27.

Pichlmayr R., Bretschneider H.J., Kirchner E., Ringe B., Lamesch P., Gubernatis G., Hauss J., Niehaus K.J., Kaukemüller J. (1988).

Ex situ Operation an der Leber. Eine neue Möglichkeit in der Leberchirurgie. *Langenbecks Arch Chir* **373**, 122-126.

Plass J.R., Mol O., Heegsma J. et al. (2002).

Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* **35**, 589-596.

Post S., Rentsch M., Gonzalez A.P., Palma P., Otto G., Menger M.D. (1995).

Importance of the first minutes of reperfusion in hepatic preservation injury. *Transplant Proc* **27**, 727-728.

Rappaport A.M., Borowy Z.J., Loughheed W.M., Lotto W.N. (1954).

Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* **119**, 11-34.

Rappaport A.M. (1973).

The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Rec* **6**, 218-228.

Rappaport A.M. (1976).

The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr Pathol* **157**, 215-243.

Rappaport A.M. (1980).

Hepatic blood flow: morphological aspects and physiological regulations. *Int Rev Physiol* **21**, 1-63.

Rappaport A.M. (1982).

Physioanatomic considerations. In: Schiff L., Schiff E.R., eds. *Disease of the liver*, 5th edn. Philadelphia: Lippincott, pp 1-57.

Redaelli C.A., Tian Y.H., Schaffner T., Ledermann M., Baer H.U., Dufour J.F. (2002).

Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology* **35**, 1082-1092.

Redinger R.N. (2003).

The coming of age of our understanding of the enterohepatic circulation of bile salts. *Am J Surg* **185**, 168-172.

Reichel C., Gao B., van Montfoort J., Cattori V., Rahner C., Hagenbuch B., Stieger B., Kamisako T., Meier P.J. (1999).

Localization and funktion of the organic anion-transporting polypeptid Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* **117**, 688-695.

Rensing H., Bauer I., Datene V., Pätou C., Pannen B.H., Bauer M. (1999).

Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthetase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med* **27**, 2766-2775.

Roma M. G., Crocenzi F. A., Mottino A.D. (2008).

Dynamic localisation of hepatocellular transporters in health and disease. *World J Gastroenterol* **14**, 6786-6801.

Rothschild M.A., Oratz M., Schreiber S.S. (1988).

Serum albumin. *Hepatology* **8**, 385-401.

Rost D., König D., Weiss G., Klar E., Stremmel, Keppler D. (2001).

Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* **121**, 1203-1208.

Rost D., Kopplow K., Gehrke S., Mueller S., Friess H., Ittrich C., Mayer D., Stiehl A. (2005).

Gender-specific expression of liver organic anion transporters in rat. *Eur J Clin Invest* **35**, 635-643.

Sardana M.K., Drummond G.S. (1986).

Tryptophan pyrrolase in heme metabolism. Comparative actions of inorganic tin and cobalt and their protoporphyrin chelates on tryptophan pyrrolase in liver. *Biochem Pharmacol* **35**, 473-478.

Sardana M.K., Kappas A. (1987).

Dual control mechanism for heme oxygenase: tin (IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad. Sci USA* **84**, 2464-2468.

Schachter D. (1988).

The hepatocyte plasma membrane: organisation and differentiation.

In: Arias I.M., Jakoby W.B., Popper H., Schachter D., Shafritz D.A., eds. The liver: biology and pathobiology. New York: Raven Press, pp 131-140.

Schmidt R., Tritschler E., Hoetzel A., Loop T., Humar M., Halverscheid L., Geiger K.K., Pannen B.H. (2007).

Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg* **245**, 931-942.

Schmitt M., Kubitz R., Wettstein M., vom Dahl S., 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 chlorodinitrobenzene. *Biol Chem* **381**, 487-495.

Schmitt M., Kubitz R., Lizun S., Wettstein M., Häussinger D. (2001).

Regulation of the dynamic localization of the rat bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* **33**, 509-518.

Schnorr B., Kressin M. (2001).

Embryologie der Haustiere. Enke Verlag, 4. Auflage.

Schuetz E.G., Strom S., Yasuda K. et al. (2001).

Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem* **276**, 39411-39418.

Sekine S., Ito K., Horie T. (2006).

Oxidative stress and Mrp2 internalization. *Free Radic Biol Med* **40**, 2166-2174.

Sekine S., Yano K., Saeki J., Hashimoto N., Fuwa T., Horie T. (2010).

Oxidative stress is a triggering factor for LPS-induced Mrp2 internalization in the cryopreserved rat and human liver slices. *Biochem Biophys Res Commun* **399**, 279-285.

Sekine S., Ito K., Saeki J., Horie T. (2011).

Interaction of Mrp2 with radixin causes reversible canalicular Mrp2 localization induced by intracellular redox status. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 1427-1434.

Shaw B.W., Wood R.P., Stratta R.J., Pillen T.J., Langnas A.N. (1989).

Stratifying the causes of death in liver transplant recipients. An approach to improving survival. *Arch Surg* **124**, 895-900.

Sherlock S., Dooley J. (2002).

Disease of the liver and biliary system. 11th edn. London: Blackwell Scientific.

Sicular A., Moore F.D. (1961).

The post-mortem survival of tissues. *J Surg Res* **1**, 16.

Silbernagel S., Despopoulos A. (2001).

dtv Atlas Physiologie, Die Funktion des menschlichen Körpers, Thieme Verlag, 5. Auflage.

Simionatto C.S., Anderson K.E., Drummond G.S., Kappas A. (1985).

Studies on the mechanism of Sn-protoporphyrin suppression of hyperbilirubinemia. *J Clin Invest* **75**, 513-521.

Simon C., Stieger B., Kullak-Ublick G.A. et al. (2007).

Intestinal expression of cytochrome P450 enzymes and ABC transporters and carbamazepine and phenytoin disposition. *Acta Neurol Scand* **115**, 232-242.

Southard J.H., van Gulik T.M., Ametani M.S., Vreugdenhil P.K., Lindell S.L., Pienaar B.L., Belzer F.O. (1990).

Important components of the UW solution. *Transplantation* **49**, 251-257.

Stanca C., Jung D., Meier P.J., Kullak-Ublick G.A. (2001).

Hepatocellular transport proteins and their role in liver disease. *World J Gastroenterol* **7**, 157-169.

Starzl T.E., Marchioro T.L., von Kaulla K.N. (1963).

Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* **112**, 135-144.

Starzl T.E., Iwatsuki S., Klintmalm G., Schröter G.P.J., Weil III. R., Koep L.J., Porter K.A. (1981).

Liver transplantation, 1980, with particular reference to Cyclosporin-A. *Transplant Proc* **13**, 281-285.

Starzl T.E., Iwatsuki S., Esquivel C.O., Todo S., Kam I., Lynch S.T., Gordon R.D., Shaw B.W. (1985).

Refinements in surgical technique of the liver transplantation. *Semin Liver Dis*, **5**, 349-356.

Starzl T.E., Iwatsuki S., Shaw B.W., Gordon R.D., Esquivel C.O. (1985b).

Immunosuppression and other nonsurgical factors in the improved results of liver transplantation. *Semin Liver Dis* **5**, 334-343.

Stieger B., Meier P.J. (2002).

Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* **64**, 635-661.

Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. (1987).

Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**, 1043-1046.

Strate T., Mann O., Kleinhans H., Schneider C., Knoefel W., Yekebas E., Standl T., Bloechle C., Izbicki J. (2003).

Systemic intravenous infusion of bovine hemoglobin significantly reduces microcirculatory dysfunction in experimentally induced pancreatitis in the rat. *Ann Surg* **238**, 765-771.

Stross C., Helmer A., Weissenberger K., Görg B., Keitel V., Häussinger D., Kubitz R. (2010).

Protein kinase c induces endocytosis of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G320-G328.

Takei Y., Gao W., Hijioka T., Savier E., Lindert K.A., Lemasters J.J., Thurman R.G. (1991).

Increase in survival of liver grafts after rinsing with warm Ringer's solution due to improvement of hepatic microcirculation. *Transplantation* **52**, 225-230.

Tanaka Y., Chen C., Maher J.M., Klaassen C.D. (2006).

Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* **82**, 258-266.

Tanaka Y., Chen C., Maher J.M., Klaassen C.D. (2008).

Ischemia-reperfusion of rat livers decreases liver and increases kidney multidrug resistance associated protein 2 (mrp2). *Toxicol Sci* **101**, 171-178.

Tang L.M., Wang Y.P., Wang K., Pu L.Y., Zhang F., Li X.C., Kong L.B., Sun B.C., Li G.Q., Wang X.H. (2007).

Exogenous biliverdin ameliorates ischemia-reperfusion injury in small-for-size rat liver grafts. *Transplant Proc* **39**, 1338-1344.

Te Koppele J.M., Thurman R.G. (1990).

Phagocytosis by Kupffer cells predominates in pericentral region of the liver lobule. *Am J Physiol* **259**, G814-G821.

Topp S.A., Krieg A., Koch A., Tidden C., Ramp U., Hohlfield T., Stoecklein N., Hosch S.B., Knoefel W.T. (2008).

Hemoglobin-glutamer 200 reduces reperfusion injury of the cold preserved rat liver by induction of heme oxygenase-1. *J Surg Res* **150**, 243-254.

Trauner M., Arrese M., Lee H., Boyer J.L., Karpen S.J. (1998).

Endotoxin down-regulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors. *J Clin Invest* **101**, 2092-2100.

Trauner M., Arrese M., Soroka C.J., Ananthanarayanan M., Koeppel T.A., Schlosser S.F. Suchy J. et al. (1997).

The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* **113**, 255-264.

Trauner M., Boyer J. (2002).

Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* **83**, 633-671.

Tredger J.M. und Davis M. (1991).

Drug metabolism and hepatotoxicity. *Gut* **32**, S34-S39.

Tremblay K.D. und Zaret K.S. (2005).

Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissue. *Dev Biol* **280**, 87-99.

Uehara T., Bennett B., Sakata S.T., Satoh Y., Bilter G.K., Westwick J.K., Brenner D.A. (2005).

JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* **42**, 850-859.

Upadhy G.A., Topp S.A., Hotchkiss R.S., Anagli J., Strasberg S.M. (2003).

Effekt of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **37**, 313-323.

Van Eyken P., Sciort R., Callea F., et al. (1988).

The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* **8**, 1586-1595.

Volti G.L., Sacerdoti D., Di Giacomo C., Barcellona M.L., Scacco A., Murabito P., Biondi A., Basile F., Gazzolo D., Abella R., Frigiola A., Galvano F. (2008).

Natural heme oxygenase-1 inducers in hepatobiliary function. *World J Gastroenterol* **14**, 6122-6132.

v. Engelhardt W, Breves G. (2000).

Physiologie der Haustiere, Enke Verlag, 1. Auflage.

Wake K., Decker K., Kirn A. et al. (1990).

Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* **118**, 173-229.

Wakil S.J., Stoops J.K, Joshi V.C. (1983).

Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* **52**, 537-579.

Wang X., Wang Y., Kim H.P., Nakahira K., Ryter S.W., Choi A.M. (2007).

Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J Biol Chem* **282**, 1718-1726.

Wanner G.A., Ertel W., Müller P., Höfer Y., Leiderer R., Menger M.D., Messmer K. (1996).

Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* **5**, 34-40.

Watanabe S., Phillips M.J. (1984).

Ca²⁺ causes active concentration of bile canaliculi: direct evidence from microinjection studies. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 6164-6168.

Waud W.R., Rajagopalan K.V. (1976).

The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependend form (type D) to an O₂-dependend form (type O). *Arch Biochem Biophys* **172**, 365-379.

Welch C.S. (1955).

A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant Bull* **2**, 54-55.

Winwood P.J., Arthur M.J.P. (1993).

Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liv Dis* **13**, 50-59.

Wisse E., De Zanger R.B., Charels K., Van der Smissen M., Mc Cuskey R.S. (1985).

The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrate, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* **5**, 683-689.

Xie W., Radominska-Pandya A., Shi Y., Simon C.M., Nelson M.C., Ong E.S., Waxman D.J., 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.

Yoshinary D., Takeyoshi I., Kobayashi M., Koyama T., Iijima K., Ohwada S., Matsumoto K., Morishita Y. (2001).

Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to University of Wisconsin solution on reperfusion injury in liver transplantation. *Transplantation* **72**, 22-27.

Young-Myeong K., Hyun-Ock P., Jeong Euy P., Yong Chul L., Je Moon W., Nam-Ho K., Yoon Kyung C., Bok-Soo L., So Ri K., Hun-Taeg C. (2011).

Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **14**, 137-167.

Yu W., Coddington D., Bitter-Suermann H. (1990).

Rat liver preservation. I. The components of UW solution that are essential to its success. *Transplantation* **49**, 1060-1066.

Yu W., Coddington D., Bitter-Suermann H. (1990).

Rat liver preservation. II. Combining UW solution with Eurocollins solution or Ringer's lactate abrogates its protective effect. *Transpl Int* **3**, 238-240.

Yun N., Eum H.A., Lee S.M. (2010).

Protective role of heme oxygenase-1 against liver damage caused by hepatic ischemia and reperfusion in rats. *Antioxid Redox Signal* **13**, 1503-1512.

Zuckerbraun B.S., Billiar T.R., Otterbein S.L., Kim P.K., Liu F., Choi A.M., Bach F.H., Otterbein L.E. (2003).

Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J Exp Med.* **198**, 1707-1716.

9 Danksagung

Ich möchte allen danken, die zur Vollendung dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn **Prof. Dr. Ernst Petzinger** für die Übernahme der gutachterlichen Endbewertung dieser Doktorarbeit im Fachbereich der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Herrn **Dr. Markus Donner** für die praktische und theoretische Betreuung, den vielen hilfreichen Ratschläge und der kompetenten und fachlich hervorragenden Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Dieter Häussinger** für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe der klinischen und experimentellen Hepatologie und für das Anvertrauen dieses wissenschaftlich hoch interessanten Themas.

Herrn **PD Dr. Stefan Topp** für die Durchführung der Tierversuche und die Bereitstellung aller Organpräparate.

Patricia Cebula für ihr unermüdliches Engagement bei der perfekten Umsetzung aller praktischen Arbeiten, der Einführung in die korrekte Laborarbeit und dem Einbringen von neuen und unentbehrlichen Ideen.

Der AG Graf, insbesondere **Katrin Haselow** und **Anette Tries**, für das nette Arbeitsklima in den gemeinsam genutzten Laborräumen und ihrer Hilfsbereitschaft, stets bemüht mir bei meinen vielen Fragen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau **PD Dr. Verena Keitel** und allen Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie für die geduldige Beantwortung aller aufkommenden Fragen, der großen Kollegialität und der Bereitstellung von Primär- und Sekundärantikörpern ganz herzlich bedanken.

Meiner Oma **Anneli**, meinem Opa **Karl-Heinz** und meiner Mutter **Dagmar**, die mich uneingeschränkt und immer bei allem was ich tat unterstützt haben, das Gelingen dieser Arbeit aber nicht mehr erleben können.

Flashpoint, Teddy, Elvis, Kurt und **Caddy** ohne die ich nie Tierärztin geworden wäre,

Herrn **Dr. Heinz-Hermann Aretz...** für alles...

aber ganz besonderer Dank gilt **Willi** und **Jazzy** – ohne die diese Arbeit nicht hätte anfertigen können.

10 Erklärung

„Hiermit erkläre ich:

die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, wurden als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten 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. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.“

Anna Krienen



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: 978-3-8359-6130-2



9 783835 196130 2