

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. D. Häussinger

**Untersuchungen zu  
Präkonditionierungsverfahren bei  
Cholestase nach warmer Ischämie und  
Reperfusion der Rattenleber**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

vorgelegt von Thilo Kolb

aus Düsseldorf

(2017)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.:  
Dekan: Univ. Prof. Dr. Nikolaj Klöcker  
Erstgutachter: PD Dr. Markus Donner  
Zweitgutachter: Prof. Dr. med. A. Krieg

Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht in :

Sebastian Braun, Patricia Cebula, Thilo Kolb, Claudia Strucks, Patrick van Caster, Diran Herebian, Inge Bauer, Benedikt Pannen, Dieter Häussinger, Markus G. Donner. **Taurine Preinduction Ameliorates Liver Injury and Periportal Bsep Expression Following Warm Ischemia and Reperfusion**

XXII International Bile Acid Meeting; Hepatic and Extrahepatic Targets of Bile Acid Signaling, 14.-15.09.2012 Vienna, Austria.

S. Braun, M. Donner, T. Kolb, C. Strucks, P. Cebula, P. van Caster, D. Herebian, I. Bauer, B. Pannen, D. Häussinger  
**Einfluss des organischen Osmolyts Taurin auf die sekretorische Funktion der Leber nach Ischämie und Reperfusion**

Anästh Intensivmed 2012; 53:370ff.

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Leberazinus nach Rappaport.

Abb. 2: Strukturformel der Aminosäure Taurin (2-Aminoethansulfonsäure).

Abb. 3: Lokalisation von Bsep im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb. 4: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Bsep nach warmer Ischämie und Reperfusion der Leber.

Abb. 5: Lokalisation von Mrp2 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb. 6: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Mrp2 nach warmer Ischämie und Reperfusion.

Abb. 7: Lokalisation von Ntcp im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb. 8: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Ntcp nach warmer Ischämie und Reperfusion.

Abb. 9: Lokalisation von Oatp1a1 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb. 10: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Oatp1a1 (Oatp1) nach warmer Ischämie und Reperfusion.

Abb. 11: Lokalisation von Oatp1a4 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb. 12: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Oatp1a4 (Oatp2) nach warmer Ischämie und Reperfusion.

Abb. 13: Lokalisation von Oatp1b2 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb. 14: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Oatp 1b2 (Oatp4) nach warmer Ischämie und Reperfusion.

Abb. 15: Lokalisation von Bsep in perivenösen und perizentralen Hepatozyten.

Abb. 16: Lokalisation von Mrp2 in perivenösen und perizentralen Hepatozyten.

Abb. 17: Immunoblotanalyse von Bsep nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etanercept und Anakinra.

Abb. 18: Immunoblotanalyse von Mrp2 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etanercept und Anakinra.

Abb. 19: Immunoblotanalyse von Ntcp nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etanercept und Anakinra.

Abb. 20: Immunoblotanalyse von Oatp1a1 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etanercept und Anakinra.

Abb. 21: Immunoblotanalyse von Oatp1a4 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etanercept und Anakinra.

Abb. 22: Immunoblotanalyse von Oatp1b2 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etanercept und Anakinra.

Abb. 23: Konzentration von IL-6 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von ischämischer Präkonditionierung (IPC), Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb.24: Konzentration von TNF- $\alpha$  nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von ischämischer Präkonditionierung (IPC), Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Abb.25: Konzentration von IL-1 $\beta$  nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von ischämischer Präkonditionierung (IPC), Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

## Abkürzungen und Symbole

<b>A.,Aa.</b>	Arteria, Arteriae
<b>A</b>	Ampere
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABC</b>	<i>ATP-binding-cassette</i>
<b>AK</b>	Antikörper
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>bspw.</b>	Beispielsweise
<b>BAR</b>	<i>Bile Acid Receptor</i> / Gallensalzrezeptor
<b>BDL</b>	<i>Bile Duct Ligation</i> / Gallengangsligatur
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>Bsep, BSEP</b>	<i>"Bile Salt Export Pump"</i>
<b>c</b>	Centi-
<b>C</b>	Celsius
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>CAR</b>	<i>Constitutive androstane receptor</i> / konstitutiver Androstanrezeptor
<b>CCK</b>	Cholezystokinin
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>D</b>	Deutschland
<b>Da</b>	Dalton
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> / Enzym gekoppelte Immunadsorption
<b>FCS</b>	<i>Foetal calf serum</i> / Fetales Kälberserum
<b>FP</b>	Fraktionierungspuffer
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Fallbeschleunigung
<b>GB</b>	Großbritannien
<b>GS</b>	Glutaminsynthetase
<b>h</b>	Stunde
<b>H</b>	Wasserstoff
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Hydrogencarbonat
<b>HN-Puffer</b>	Homogenisierungs-Puffer
<b>HNF</b>	<i>Hepatocyte nuclear factor</i> / nukleärer Hepatozytenfaktor
<b>HRP</b>	<i>Horseradishperoxidase</i> / Meerrettichperoxidase
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ICAM</b>	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
<b>IPC</b>	Ischämische Präkonditionierung
<b>IR</b>	Ischämie und Reperfusion
<b>IUPAC</b>	<i>International union of pure and applied chemistry</i>
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Intravenös
<b>k</b>	Kilo
<b>K</b>	Kalium
<b>l</b>	Liter

<b>λ</b>	Wellenlänge Lambda
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>Lig.</b>	Ligamentum
<b>LPS</b>	Lipopolysacharid
<b>LSM</b>	Laserscanningmikroskop
<b>μ</b>	Mikro
<b>m</b>	Milli
<b>m</b>	Meter
<b>M</b>	Mol
<b>MAPK</b>	<i>"Mitogen activated protein kinase"</i>
<b>Min</b>	Minute
<b>Mrp</b>	<i>"Multidrug resistance protein"</i>
<b>Na</b>	Natrium
<b>Ntcp NTCP</b>	<i>Natrium taurocholat cotransporting peptide</i>
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>Oatp OATP</b>	<i>Organic anion transporting peptide</i>
<b>o.g.</b>	oben genannt
<b>PBC</b>	Primär biliäre Zirrhose
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffer saline / Phosphat gepufferte Salzlösung</i>
<b>pH</b>	<i>Potentia hydrogeni</i>
<b>PI3</b>	Phosphatidyl-inositol-3
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>pp</b>	Periportal(feld)
<b>PSC</b>	primär sklerosierende Cholangitis
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>PXR</b>	Pregnan-X-Rezeptor
<b>RAR</b>	<i>"Retinoid acid receptor"</i>
<b>Rlst-1</b>	<i>"Rat liver specific organic anion transporter 1"</i>
<b>RXR</b>	Retinoid X receptor
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate / Natriumdodecylsulfat</i>
<b>s.o.</b>	Siehe oben
<b>TBS-T</b>	<i>Tris buffered saline / Tris gepufferte Salzlösung + Tween</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>Tris</b>	Tris-hydroxymethylaminomethan
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>U</b>	Umdrehung
<b>V. Vv.</b>	Vena, Venae
<b>Ver.</b>	Version
<b>vs</b>	Versus
<b>WB</b>	Western Blot
<b>z.B.</b>	Zum Beispiel
<b>ZO-1</b>	Zonula Occludens 1

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Aufbau der Leber	1
1.1.1 Makroskopische Anatomie der Leber	1
1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Leber	2
1.1.3 Embryonale Entwicklung der Leber	5
1.2 Aufgaben der Leber	5
1.3 Transportproteine der Leber	7
1.3.1 Basolaterale Transportproteine	7
1.3.2 Apikale Transportproteine	10
1.3.3 Verteilungsmuster von hepatischen Transportproteinen im Leberläppchen	12
1.4 Formen der Cholestase und Regulation von Transportproteinen	13
1.4.1 Formen der Cholestase beim Menschen	13
1.4.2 Mechanismen der Cholestase in Tiermodellen	14
1.4.3 Leberschädigung bei Ischämie und Reperfusion	15
1.4.4 Cholestase bei warmer Ischämie und Reperfusion	16
1.5 Taurin: Wirkung und Bedeutung bei Lebererkrankungen	18
1.6 Ischämische Präkonditionierung	19
1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	20
<b>2 Material</b>	22
2.1 Geräte	22
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	23
2.3 Lösungen und Puffer	24
2.4 Antikörper	26
2.4.1 Primärantikörper	26
2.4.2 Sekundärantikörper	27
<b>3 Methoden</b>	28
3.1 Histologische Methoden	28
3.1.1 Indirekte Immunfluoreszenz	28
3.1.2 Herstellung der Gewebeschnitte mit dem Kryotom	28
3.1.3 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte	29
3.1.4 Konfokale Laserscanningmikroskopie	29

3.1.5 Densitometrische Auswertung von Immunfluoreszenzen	30
3.2 Proteinanalytische Methoden	30
3.2.1 Gesamtmembranpräparation aus einem Leberpräparat	30
3.2.2 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test	31
3.2.3 SDS-PAGE	32
3.2.4 Sammelgel	32
3.2.5 Trenngele	33
3.2.6 Immunoblot	34
3.2.7 Proteintransfer	35
3.2.8 Auswertung des Immunoblot	36
3.3 ELISA	37
3.3.1 Anfertigung von Lysaten für ELISA	37
3.3.2 Durchführung des ELISA	37
3.4. Tierversuche	38
<b>4. Ergebnisse</b>	40
4.1 Konfokale Laserscanningmikroskopie von Immunfluoreszenzpräparaten	40
4.1.1 Zonierte Regulation von hepatischen Transportproteinen nach warmer Ischämie und Reperfusion	40
4.1.2 Ergebnisse der Präkonditionierung mit Taurin	41
4.1.3 Ergebnisse der Ischämischen Präkonditionierung	42
4.1.4 Ergebnisse der Präkonditionierung mit Etanercept und Anakinra	42
4.2 Proteinexpression von hepatischen Transportproteinen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie Effekt verschiedener Präkonditionierungsverfahren	51
4.2.1 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach warmer Ischämie und Reperfusion	51
4.2.2 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach Präkonditionierungsverfahren	51
4.3 Zytokinkonzentration nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie Einfluss von verschiedenen Präkonditionierungsverfahren	59
4.3.1 IL-6 und TNF- $\alpha$	59
4.3.2 IL-1 $\beta$	62
<b>5. Diskussion</b>	64
5.1 Folgen einer Ischämie und Reperfusion der Leber für die hepatobiliäre Sekretion	64
5.2 Mechanismen der zonalen Regulation von hepatischen Transportproteinen nach warmer Ischämie und Reperfusion	65

5.3 Fehlender Effekt einer pharmakologischen Hemmung von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$	67
5.4 Therapeutischer Effekt von Taurin auf die Expression kanalikulärer Transporter nach warmer Ischämie und Reperfusion	69
5.5 Therapeutischer Effekt einer ischämischen Präkonditionierung auf die Expression hepatobiliärer Transporter nach warmer Ischämie und Reperfusion	71
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>74</b>
<b>8. Eidesstaatliche Versicherung</b>	<b>75</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Aufbau der Leber

#### 1.1.1 Makroskopische Anatomie der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers. Die gesunde Leber wiegt im Durchschnitt zwischen 1200g-1800g abhängig vom Geschlecht. Sie wird durch das Ligamentum falciforme hepatis in einen linken und einen rechten Leberlappen unterteilt und untergliedert sich in acht Segmente (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Zilles und Tillmann, 2010).

Die Leberoberfläche ist aufgeteilt in die dem Zwerchfell anliegende Facies diaphragmatica und die Facies visceralis. Nach kaudal geht die Facies diaphragmatica an der Margo inferior in die Facies visceralis über. In der Sagittalen befindet sich gegenüberliegend ventral die Gallenblase und dorsal der Gallenblase die V. cava inferior. Diese Anordnung wird medial durch die Leberpforte ergänzt und unterteilt den großen rechten Leberlappen, nochmals medial in den ventral gelegenen Lobus quadratus und den kaudal gelegenen Lobus caudatus (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Zilles und Tillmann, 2010).

Die Galle fließt in den durch die Zellmembranen der Hepatozyten gebildeten Gallekanälchen weiter über die Hering-Kanälchen in die interlobulären Gallengänge. An der Leberpforte vereinigen sich schließlich die galleführenden Ductus hepaticus sinister et dexter zum Ductus hepaticus communis. Medial davon treten die A. hepatica als Vas privatum und die V. porta hepatis als Vas publicum, welches nährstoffreiches Blut aus dem Intestinaltrakt führt, ein. Die Trias von Gallengang, Leberarterie und Portalvene verzweigen sich gemeinsam und gliedern so die Leber in Segmente. Hingegen halten sich die Lebervenen, welche das venöse Blut der Leber zur V. cava inferior ableiten nicht an diese Segmentierung (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch 2009; Zilles und Tillmann, 2010).

Der Lymphabfluss der Leber wird durch ein subperitoneales und ein intraparenchymatöses Lymphgefäßnetz drainiert. Die Lymphgefäße münden einerseits in die mediastinalen Lymphknoten, die Hiluslymphknoten und die coelialen Lymphknoten, sowie über Anastomosen in die gastralen und peripankreatischen Lymphknoten. Nerval wird die Leber sympathisch über das Ganglion coeliacum und parasymphatisch über den Truncus vagalis anterior innerviert (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Zilles und Tillmann, 2010).

### 1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Leber

Das Leberparenchym ist größtenteils epithelialer Herkunft. Die Leberzellen, die sogenannten Hepatozyten, ordnen sich nach einem festen Schema an zusammen mit den dort endenden Blutgefäßen, den Vasa sinusoidea, auch Lebersinusoide genannt (Zilles und Tillmann, 2010).

Die Sinusoide werden durch die V. portae und die A. hepatica propria gespeist und sind durch ein diskontinuierliches Endothel ausgekleidet, welches sich nach außen in einen flüssigkeitsgefüllten Raum von 0,3 µm fortsetzt, den sogenannten Disse-Raum. Dort und in der Wand der Lebersinusoide befinden sich weitere, wichtige Zellen der Leber wie die Kupffer-Zellen, die Sinusendothelzellen und die Ito-Zellen (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Zilles und Tillmann, 2010).

Die Hepatozyten sind die größte Zellpopulation der Leber. Sie haben eine polare Anordnung und bestehen aus einem apikalen Pol, sowie einem kleinen lateralen Anteil und einem größeren basalen Anteil. Die Hepatozytenmembran ist mit Transportproteinen versehen, die es ermöglichen, basal Substanzen aufzunehmen und apikal diese in die Galle abzugeben. Desweiteren stehen die Hepatozyten über gap junctions in Verbindung und durch tight junctions wird eine Vermischung von Blut und Galle verhindert. Die Hepatozyten enthalten teilweise zwei Kerne, größtenteils einen polyploiden Chromosomensatz und zeigen einen starken Besatz mit Zellorganellen wie z.B. Mitochondrien und mit glattem oder rauem endoplasmatischem Retikulum, was auf den sekretorischen

Charakter als exokrine Drüse schließen lässt (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch 2009).

Es gibt nach funktionellen und anatomischen Gegebenheiten verschiedene Möglichkeiten der Gliederung der Leber. Die Anordnung der Leberzellen zu den jeweiligen Blutgefäßen lässt sich durch das Zentralvenenläppchen, oder den Leberazinus, oder das Portalläppchen beschreiben. Charakteristisch für das Zentralvenenläppchen sind die Ausmaße von ca. 1 mm im Durchmesser und 2 mm in der Höhe. In der Mitte des Läppchens befindet sich die Zentralvene. Um die Zentralvene ordnen sich die Sinusoide und die Hepatozyten radiär an. In den Ecken des polygonalen Zentralvenenläppchens befindet sich ein Periportalfeld, welches auch als Periportaltrias oder Glissonsche Trias bezeichnet wird und aus der zuführenden Portalvene, der Leberarterie und dem abführenden Gallengang besteht. Charakteristisch für das Portalvenenläppchen ist, dass die periportale Trias im Zentrum der funktionellen Einheit steht. In den Ecken des Portalvenenläppchens befindet sich die Lebervene und im Zentrum die Glissonsche Trias. Diese histologische Einteilung der Leber ist die gängige Vorstellung der funktionellen Einheit der Leber und wird auch als klassisches Leberläppchen bezeichnet.

Charakteristisch für den Leberazinus nach Rappaport hingegen ist die Sauerstoffverteilung entlang der Sinusoide, die die differentielle Funktion von Hepatozyten verschiedener Lokalisationen bestimmt. Der Leberazinus spannt sich rautenförmig zwischen zwei gegenüberliegenden Zentralvenen einerseits und zwei Leberarterien einer Glissonschen Trias andererseits auf. Die Einteilung der Zonen des Azinus ist somit abhängig vom Sauerstoffgehalt des Blutes, welcher in der Zone 1 an der Glissonschen Trias hoch ist und in der Zone 3 in Höhe der Zentralvene niedrig. Das Gebiet des intermediären Sauerstoffgehaltes wird als Zone 2 bezeichnet (Jungermann, 1988; Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

Die Sinusendothelzellen kleiden die Wand des Lebersinus aus, enthalten Poren und lassen somit flüssige, azelluläre Bestandteile des Blutes in den Disse-Raum. Sie können außerdem die Durchblutung der Sinusoide steuern durch Synthese von vasoaktiven Substanzen wie Prostazyklin und Endothelin

(Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2009; Zilles und Tillmann, 2010).

Die Ito-Zellen (oder engl. *stellate-cells*) dienen als Fettspeicher und bevorraten einen Großteil des im Körper vorkommenden Vitamin A. Desweiteren sind sie potentielle Kollagenproduzenten und spielen eine Rolle in der Pathogenese von Fibrosevorgängen der Leber (Benninghoff und Drenckhahn 2008; Zilles und Tillmann, 2010). Desweiteren werden den Ito-Zellen Eigenschaften als Stammzellen zugewiesen (Kordes et al., 2013).

Die Kupffer-Zellen sind Zellen des Makrophagensystems. Sie sind mit ihren Pseudopodien in den Lebersinusoiden verankert. Zu ihren Aufgaben zählen die Aufnahme, Verarbeitung und Präsentation von Antigenen, sowie Phagozytose von Fremdmaterial. Desweiteren sind die Kupffer-Zellen Zytokinproduzenten und somit eine entscheidende Zellpopulation der Akuten-Phase-Reaktion in der Leber (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2009; Zilles und Tillmann, 2010; Marra and Tacke, 2014).

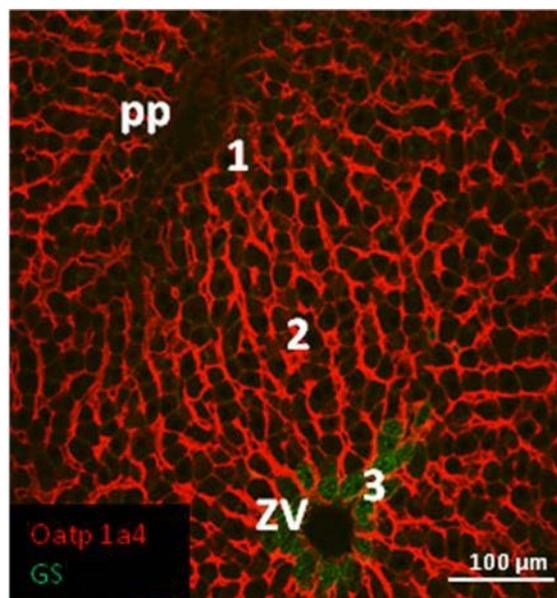


Abb. 1: Darstellung des Leberazinus nach Rappaport anhand der Lokalisation von Oatp 1a4. Kryoschnitt mit polyklonalem AK K22 gegen Oatp1a4 (rot) und monoklonalem AK gegen Glutaminsynthetase (grün). Einteilung der Leber in metabolische Zonen nach Rappaport: 1 = Zone 1; 2 = Zone 2; 3 = Zone 3; pp = Periportalfeld ; zv = Zentralvene.

### 1.1.3 Embryonale Entwicklung der Leber

Die Leber entwickelt sich aus dem Entoderm. Am 22. Tag der Entwicklung verdickt sich das Entoderm zur hepatischen Platte, die das Leberdivertikel ausbildet. Dessen ventrale Anteile werden die extrahepatischen Gallengänge bilden. Aus dem Divertikulum cysticum bildet sich die Gallenblase und der Ductus cysticus. Somit befinden sich epitheliale Stränge, die sich später zur Leber differenzieren und blutgefüllte Sinus in der Leber. Im weiteren Verlauf bilden sich ein ventrales und ein dorsales Mesogastrium. Die Leberanlage wächst in das ventrale Mesogastrium ein, welches später als Lig. falciforme persistiert. Ab der 12. Embryonalwoche entwickelt sich das Gallengangsystem. Ab der 7. Woche bildet sich das Gefäßsystem der Leber aus. Bis zum 7. Entwicklungsmonat ist die Leber an der Hämatopoese maßgeblich beteiligt (Moore und Persaud, 2007; Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

### 1.2 Aufgaben der Leber

Eine Hauptaufgabe der Leber liegt in der Produktion und Sekretion von Galle. Die sogenannten primären Gallensäuren sind Cholat und Chenodeoxycholot. Die Leberzellen scheiden die cholephilen Substanzen wie z.B. Gallensäuren, Phospholipide, Cholesterin, Elektrolyte, Bilirubin, sowie organische Anionen und Kationen am apikalen Pol in die Gallenkanälchen aus. Durch die osmotische Aktivität der Substanzen strömt Wasser nach und es bildet sich die Primärgalle, die in den Gallengängen weiter modifiziert wird zur Sekundärgalle. Die Aufgabe der Galle ist die Emulgierung von Fetten und fettlöslichen Substanzen wie Vitaminen und Medikamenten im Intestinum, sowie die Ausscheidung vieler endogener und exogener Stoffe aus dem Körper. Die Gallensalze unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf und werden zum überwiegenden Teil im Ileum über die Enterozyten mittels spezifischer Transportproteine aufgenommen und durch die Portalvene der Leber wieder zugeführt. Am basalen Pol der Hepatozyten (vgl. Abschnitt 1.1.2) befinden sich Transportproteine für die Aufnahme von Anionen und Kationen. Es findet ein Transport vom basalen Pol zum apikalen Pol des Hepatozyten statt, bei dem die aufgenommenen Stoffe nach Metabolismus und intrazellulären Transport in

modifizierter Form über Transportproteine sezerniert werden (Klinke und Silbernagl, 2005; Löffler und Petrides, 2006; Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

Nach Aufnahme von Substanzen in den Hepatozyten spielt die intrazellulär ablaufende Biotransformation eine wichtige Rolle in der Generierung von gallepflichtigen Substanzen. Sie lässt sich in zwei Schritte unterteilen und findet im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten statt. Dort erfolgt im ersten Schritt eine Oxidation oder Reduktion und im zweiten Schritt eine Konjugation mit Glucuronsäure oder Sulfat. Hierdurch wird eine bessere Ausscheidbarkeit erzielt. Dies leistet einen wichtigen Beitrag zur Detoxifikation und zum Abbau von endogenen und exogenen Substanzen im menschlichen Körper (Pape und Klinke, 2005; Löffler und Petrides, 2006; Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

Die Leber ist ferner ein zentrales Organ für den Intermediärstoffwechsel.

Für den Kohlenhydratstoffwechsel spielt die Leber eine wichtige Rolle. Die Leber speichert Glukosereserven in Form von Glykogen. Durch Glykogenolyse wird Glukose mobilisiert. Zusammen mit der Glukoneogenese wird die Glukosehomöostase gewährleistet.

Die Leber stellt eine Vielzahl von Funktionsproteinen her wie z.B. Albumin, welches als Transportprotein für Substanzen im Plasma dient und entscheidend für den kolloidosmotischen Druck ist. Hepatisch synthetisiertes Glutathion dient als Antioxidans. Die meisten plasmatischen Gerinnungsfaktoren des Blut werden ebenfalls in Hepatozyten hergestellt.

Aus dem Aminosäurestoffwechsel anfallende Ammoniumionen werden in der Leber über den Harnstoffzyklus entgiftet. Der entstehende Harnstoff wird über das Blut zu den Nieren transportiert, um dort mit dem Urin ausgeschieden zu werden. Der Harnstoffzyklus findet sowohl im Mitochondrium als auch im Zytosol statt. Aus Ammoniumionen wird initial durch Kondensation mit Bikarbonat Carbamoylphosphat, welches durch mehrere enzymatische Schritte schließlich zu Harnstoff metabolisiert wird (Pape und Klinke, 2005; Löffler und Petrides, 2006; Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

Die Leber ist ferner das zentrale Organ des Fettstoffwechsels. "*Very-low-density-lipoproteins*" (VLDL) werden in der Leber synthetisiert, sezerniert und werden nach Abgabe von Triglyceriden an das Fettgewebe zu "*Low-density-lipoproteins*", die Cholesterin zu extrahepatischen Geweben transportieren. Überschüssiges LDL wird über den LDL-Rezeptor wieder aufgenommen. In der Leber findet die  $\beta$ -Oxidation statt, in der aus Fettsäuren Acetyl-CoA hergestellt wird, welches für die Ketogenese oder für den Citratzyklus weiterverwendet werden kann. Ferner ist die Leber als Speicherorgan für Vitamine (z.B. in den Ito-Zellen) und Spurenelemente wie Kupfer und Eisen von Bedeutung (Pape und Klinke, 2005; Löffler und Petrides, 2006; Benninghoff und Drenckhahn, 2008).

### 1.3 Transportproteine der Leber

#### 1.3.1 Basolaterale Transportproteine

Das "*Natrium-Taurocholat-Cotransporting-Peptide*" (NTCP/Ntcp) ist ein Transportprotein der basalen Membran des Hepatozyten. Es handelt sich um einen natriumabhängigen Aufnahmetransporter/Symporter (Gensymbol SLC10A1). NTCP umfasst 362 Aminosäuren beim Menschen (Meier et al., 1997). In der Ratte besteht er aus 349 Aminosäuren und wird hier wiederum als Ntcp bezeichnet. Das humane NTCP hat eine Aminosäurehomologie von 77% zu Ntcp der Ratte (Meier et al., 1997; Hagenbuch and Dawson, 2004). Das NTCP-Gen befindet sich auf Chromosom 14q24.1. (Hagenbuch und Meier, 1994). Das Protein umfasst variierend 7-9 Transmembrandomänen mit einem extrazellulärem N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus (Hagenbuch und Meier, 1994). In der fetalen Rattenleber tritt Ntcp erstmals um den 20. Entwicklungstag auf (Hardikar et al., 1995).

Der NTCP-Promoter wird reguliert durch das Homeoboxgen HEX, welches ein Transkriptionsfaktor für die hepatische Entwicklung ist (Denson et al., 2000). NTCP/Ntcp ist in der Lage, Taurocholat und andere Gallensäuren der selben Stöchiometrie im Verhältnis 2:1 Natrium zu Gallensäuren aufzunehmen und vermittelt somit die natriumabhängige Gallensalzaufnahme (Kullak-Ublick et al.,

2000; Hagenbuch und Dawson, 2004). Desweiteren nimmt der Transporter Östrogenkonjugate, Phalloidin und Medikamente wie bspw. Bumethanid und Ciclosporin A auf (Meier et al., 1997; Kusters und Karpen, 2008). Über das Vorkommen von NTCP in verschiedenen Organen, bestehen unterschiedliche Auffassungen. So wird berichtet (Meier und Stieger, 2002) NTCP werde exklusiv in Hepatozyten exprimiert. Desweiteren wird ein zusätzliches Vorkommen von NTCP in pankreatischen Azinuszellen diskutiert (Hagenbuch und Dawson, 2004). NTCP wird reguliert durch die Transkriptionsfaktoren HNF-3 $\beta$ , HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\alpha$ , sowie über RXR:RAR (Trauner et al., 1998; Hayhurst et al., 2001; Shih et al., 2001). So wird beschrieben, dass die Herabregulation von Ntcp durch Endotoxin durch eine verringerte Bindung von HNF-1 an den Ntcp-Promoter vermittelt wird (Trauner et al., 1998). Die Translokation von NTCP aus den Endosomen in die Plasmamembran zur Steigerung des Taurocholatuptakes in der Leber ist cAMP-abhängig und wird über PKA mediiert (Mukhopadhyay et al., 1997; Dranoff et al., 1999). NTCP ist homogen im Leberläppchen verteilt (Stieger, 2011).

### *"Organic-anion-transporting-peptides"*

Die OATP/Oatp *"organic-anion-transporting-peptides"* stellen multispezifische Transporter für organische Anionen und Gallensalze dar, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Gemeinsames Merkmal aller OATP/Oatp-Isoformen ist die basolaterale Lokalisation. Die humanen Orthologen werden als OATP und die Orthologen der Ratte als Oatp bezeichnet. Die im Folgenden beschriebenen Transporter der Oatp-Familie kommen ausschließlich in der Ratte und artverwandten Nagetieren vor. Der Mensch besitzt ebenfalls Proteine der OATP-Familie. In der Leber werden die Transportproteine OATP1B1, OATP1A2, OATP2B1 und OATP1B3 exprimiert (Kullak-Ublick et al., 2001; Meier und Stieger, 2002).

Oatp1a1 wird in der Literatur auch als Oatp-1 bezeichnet (Gensymbol SLC21a1). Es wird in multiplen Organen, sowie u.a. in der basolateralen Hepatozytenmembran der Rattenleber exprimiert. Das Gen für Oatp1a1 liegt auf Chromosom 4q44 (Hagenbuch und Dawson, 2004). Oatp 1a1 wird

außerhalb der Rattenleber im S3-Segment des proximalen Tubulus der Niere, im Gehirn, sowie in Lunge und Darm von Ratten und artverwandten Nagetieren exprimiert (Gao et al., 1999; Tamai et al., 2000).

Oatp1a1 ist eines von vielen Mitgliedern der Oatp-Proteinfamilie und wurde als erstes Protein dieser Familie entdeckt (Meier, 1995). Der Transporter umfasst 670 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 80 kDa auf (Jacquemin et al., 1994). Der Transporter besitzt 12 Transmembrandomänen (Jacquemin et al., 1994). Oatp1a1 ist ein multispezifischer Transporter. Der Transporter nimmt natriumunabhängig Cholat, Taurocholat, Bilirubin, Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Medikamente wie Enalapril und Pravastatin, sowie den Farbstoff Bromsulfophtalein auf (Kullak-Ublick et al., 2000). Oatp1a1 kann durch die Transkriptionsfaktoren HNF-1 $\alpha$  und HNF-4 $\alpha$  reguliert und hierdurch vermehrt exprimiert werden (Shih et al., 2001; Hayhurst et al., 2001). Es ist in der Leber gleichmäßig lobulär verteilt (Meier und Stieger, 2002).

Oatp1a4 wird in der Literatur auch als Oatp2 bezeichnet. Oatp2 wurde erstmals 1997 beschrieben (Noé et al., 1997) (Gensymbol slc21a5). Seine Transportspezifität ist ähnlich zu der von Oatp-1, jedoch hat es im Vergleich zu Oatp-1 eine vermehrte Affinität für neutrale Stoffe (Trauner und Boyer, 2003). Oatp 1a4 transportiert organische Anionen und organische Kationen (Kullak-Ublick, 1999), Gallensäuren wie i.A. Taurocholat und Glykocholat, Sexualhormone wie Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Östradiol, Schilddrüsenhormone wie Trijodthyronin T3 und Tetrajodthyronin T4, sowie Medikamente wie Digoxin und Pravastatin (Trauner und Boyer, 2003).

Das Gen für Oatp1a4 liegt auf Chromosom 4 (Hagenbuch und Dawson, 2004). Oatp1a4 ist ca. 77% identisch zu Oatp1a1 und besteht aus 661 Aminosäuren (Noé et al., 1997; Reichel et al., 1999). Wie Oatp1a1 ist auch Oatp1a4 nicht auf die basolaterale Hepatozytenmembran begrenzt, sondern findet sich in multiplen Organen des Rattenorganismus wieder, wie bspw. in Endothelzellen der Bluthirnschranke, im Plexus choroideus und im Auge (Gao et al., 1999; Kullak-Ublick, 1999). Der Oatp1a4-Promoter wird durch den nukleären Pregnan-X-Rezeptor (PXR) aktiviert (Staudinger et al., 2001; Meier Stieger 2002). Andererseits wird Oatp1a4 vermindert in HNF-1 $\alpha$  defizienten Knockout-Mäusen exprimiert (Shih et al., 2001). Oatp1a4 ist im Gegensatz zu Oatp1a1

nicht gleichmäßig im Leberlobulus verteilt, sondern zeigt eine hohe Expression in perivenösen Arealen, entsprechend der Zone 3 im Leberazinus und eine niedrigere Expression in Hepatozyten der Zone 1. Die Glutaminsynthetase positiven Hepatozyten in unmittelbarer Umgebung der Zentralvene weisen eine geringe Expression von Oatp1a4 auf (Kakyo et al., 1999; Reichel et al., 1999; Trauner und Boyer, 2003).

Oatp1b2 (Oatp4) wurde 2000 als dritte Oatp-Isoform (Gensymbol *slc21a10*) aus der Rattenleber kloniert (Cattori et al., 2000). Es handelt sich um die "erweiterte" Isoform von "*rat-liver-specific-transporter*" 1 (*rlst-1*) (Kakyo et al., 1999; Kullak-Ublick et al., 2001) und ist ebenfalls ein basolaterales Transportprotein der Hepatozytenmembran. Oatp1b2 wird in der Leber exprimiert (Cattori et al., 2001) und weiterhin im Plexus choroideus (Hagenbuch und Dawson, 2004). Das Gen für Oatp1b2 liegt auf Chromosom 4q44. (Hagenbuch und Dawson, 2004). Oatp1b2 ist zu 43% identisch mit Oatp1a1 und zu 44% mit Oatp1a4 (Kullak-Ublick et al., 2000; Meier und Stieger, 2002). Der Transporter weist eine stärkere Homologie zu den Transportern OATP-C und OATP-8 im Menschen auf (Fischer et al., 2005). Transportiert werden Gallensalze, CCK-8 und Mikrozystin, sowie weitere organische Anionen (Ismair et al., 2001; Fischer et al., 2005). HNF1- $\alpha$  reguliert die Transkription des Oatp1b2-Gens (Trauner und Boyer, 2003).

### 1.3.2 Apikale Transportproteine

#### *BSEP / Bsep*

*"Bile salt export pump"* (BSEP/Bsep) ist ein Transportprotein der apikalen Hepatozytenmembran. BSEP für das humane Ortholog oder Bsep für das Ortholog der Ratte, gehört zu der Familie der *"ATP-binding-cassette-transporter"* (ABC-Transporter), die per Definitionem ATP-abhängige Transporter sind. Das Gensymbol ist ABCB11/Abcb-11 (Meier and Stieger, 2002). Es wurde 1995 erstmals beschrieben als *"Sister-of-P-Glycoprotein"* (Spgp/SPGP) (Childs et al., 1995). Durch die Kopplung des Transportes von Gallensäuren an die Hydrolyse von ATP ist es BSEP/Bsep möglich, gegen

höchste Konzentrationsgradienten von 1:100-1:1000, Gallensalze zu exportieren (Trauner und Boyer, 2003). Bsep trägt entscheidend zum gallensalzabhängigen Gallefluss bei (Geier et al., 2007). Bsep besteht aus 1321 Aminosäuren und 12 Transmembrandomänen (Childs et al., 1998; Meier und Stieger, 2002). Das Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 2q24 (Childs et al., 1998). BSEP wird durch das Heterodimer FXR/BAR reguliert, welches die Transkription von Bsep steuert und auf diese Weise BSEP/Bsep z.B. durch Gallensäuren transkriptionell induzieren kann (Kullak-Ublick et al., 2004). Der Einbau von subapikalen Vesikeln in die apikale Hepatozytenmembran wird stimuliert durch Phosphorylierung des Transportproteins durch die PI3-Kinase, cAMP, Gallensäuren und Hypoosmolarität (Kipp und Arias, 2000; Kipp et al., 2001; Schmitt et al., 2001; Suchy und Ananthanarayanan, 2006). Bsep transportiert monovalente Gallensäuren und weist beim Transport eine absteigende Affinität für Gallensäuren in folgender Reihenfolge auf: Taurochenodeoxycholat, Taurocholat, Tauroursodeoxycholat und Glycocholat (Childs et al., 1998; Gerloff et al., 1998; Lecureur et al., 2000; Byrne et al., 2002; Noé et al., 2002; Kusters und Karpen, 2008). Eine BSEP-Defizienz beim Menschen, führt zu PFIC 2 (progressive familiäre intrahepatische Cholestase) (Strautnieks et al., 1997).

#### *"Multi-drug-resistance-associated-Protein-2" (MRP2/Mrp2)*

Das humane Ortholog wird als MRP2 bezeichnet, das Ortholog der Ratte als Mrp2. Es gehört ebenfalls zu der Familie der ABC-Transporter. Das Gensymbol ist ABCC2/Acbc2 und der Genlokus befindet sich auf Chromosom 10q24 (Büchler et al., 1996; Nies und Keppler, 2007). MRP2 ist das zweite Protein der Familie der *"multidrug resistance"* Proteine (Büchler et al., 1996). Der Transporter ist ein integrales Membranprotein und wird in verschiedenen Organen, wie bspw. im proximalen Tubulus der Niere, den Enterozyten, der Plazenta und dem Gallenblasenepithel exprimiert (Keppler und König, 1997; Nies und Keppler, 2007). In Hepatozyten ist MRP2 in der apikalen Membran lokalisiert. MRP2 hat ein Molekulargewicht von 190 kDa und besteht aus 1545 Aminosäuren (Keppler und König, 1997; Nies und Keppler, 2007).

Hepatozelluläres MRP2/Mrp2 scheidet vor allem divalente Gallensäuren in die Kanalikuli, sowie endogene und exogene organische Substanzen, die an Glutathion, Sulfat oder Glucuronsäure gekoppelt sind, in die Galle aus (Meier und Stieger, 2002; Kullak-Ublick et al., 2004; Tanaka et al., 2008) und weist eine breite Substratspezifität auf (Keppler und König, 1997). Desweiteren wurde MRP2 in verschiedenen Tumoren (z.B. hepatozelluläres Karzinom, Ovarialkarzinom) des Menschen nachgewiesen (Cui et al., 1999; Nies und Keppler, 2007). MRP2 besitzt die Fähigkeit Chemotherapeutika aus der Tumorzelle zu exportieren und vermittelt so Chemotherapeutikaresistenz bei Tumoren (König 1999).

Die Regulation von MRP2 ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Retinoid-X-Rezeptor RXR, Farnesoid-X-Rezeptor FXR- $\alpha$ , "*Constitutive-androstane-Receptor*" CAR und Pregnane-X-Rezeptor PXR (Kast et al., 2002). MRP2 ist ein konstitutionell aktiver Transporter, der jedoch durch Xenobiotika wie Clofibrat oder Hormone wie Ethinylestradiol und bei cholestatischen Erkrankungen umfangreich reguliert wird (Nies und Keppler, 2007).

Die Defizienz von MRP2 beim Menschen wurde als die Ursache für das Dubin-Johnson Syndrom identifiziert (Kartenbeck et al., 1996; Hashimoto et al., 2002).

### 1.3.3 Verteilungsmuster von hepatischen Transportproteinen im Leberläppchen

In der gesunden Leber zeigen die basolateralen Transportmoleküle Ntcp und Oatp1a1 eine homogene Verteilung im Leberläppchen. Oatp1a4 und Oatp1b2 zeigen eine kontinuierliche Zunahme der Expression von Zone 1 nach Zone 3. Oatp1a4 weist jedoch in den unmittelbar perizentralen Leberzellen der Zone 3 jedoch eine geringe Expression auf (Reichel et al., 1999; Cattori et al., 2000; Donner et al., 2007). Die apikalen Transportproteine Bsep und Mrp2 zeigen ebenfalls eine homogene Zonierung im Leberläppchen (Baier et al., 2006; Donner et al., 2007).

## 1.4 Formen der Cholestase und Regulation von Transportproteinen

### 1.4.1 Formen der Cholestase beim Menschen

Als Cholestase bezeichnet man eine Störung der Gallebildung oder -sekretion in der Leber. Die Ursachen sind vielfältig. Sonographisch unterscheidet man eine intrahepatische und extrahepatische Cholestase.

Eine intrahepatische Cholestase tritt bei Störungen der hepatischen oder cholangiozellulären Sekretion von cholephilen Substanzen auf, ferner bei Störungen des Galleflusses in den kleinen Gallewegen. Intrahepatische Ursachen einer Cholestase können cholestatische Verlaufsformen von Hepatitiden, die bspw. durch Viren induziert sind, darstellen (Jüngst et al., 2013). Ursächlich für virale Hepatitiden sind vor allem die Hepatitisviren (Typ A-E), sowie hepatotrope Viren wie CMV und EBV. Eine weitere, wichtige Rolle in der Entstehung einer intrahepatischen Cholestase stellen medikamentös-toxische Ursachen dar, wie Medikamente oder Intoxikationen, z.B. mit Phalloidin (Zollner und Trauner, 2008). Seltener Ursachen sind chronische Erkrankungen der intrahepatischen Gallenwege, wie die Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) oder die Primär biliäre Zirrhose (PBC) (Zollner und Trauner, 2008). Bei Frauen kann in der Schwangerschaft eine idiopathische Schwangerschaftscholestase auftreten (Zollner und Trauner, 2008). Postoperativ kann eine Cholestase auftreten nach Leberteilektomie, oder auch nach Lebertransplantation (Fusai et al., 2006). Sehr selten ist eine intrahepatische Cholestase auf dem Boden eines angeborenen Mangels an hepatobiliären Transportproteinen in der apikalen Hepatozytenmembran, wie z.B. bei der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase (PFIC) Typ 1-3 (Zollner und Trauner, 2008).

Extrahepatischen Ursachen einer Cholestase liegt eine Abflussstörung der Galle zu Grunde. Entweder liegt eine intraluminale Obstruktion der Gallengänge vor durch ein Konkrement, eine Strikture oder einen Tumor. Alternativ kann auch eine extraluminale Kompression vorliegen, durch einen umliegenden entzündlichen Prozess oder einen Tumor.

#### 1.4.2 Mechanismen der Cholestase in Tiermodellen

Zur Untersuchung molekularer Mechanismen einer Cholestase gibt es verschiedene tierexperimentelle Ansätze.

Die Endotoxingabe in Form von Lipopolysacharid löst eine inflammatorische Cholestase aus. Die Gabe von Estradiol ist ein Modell für Kontrazeptiva- bzw. schwangerschaftsassozierte Cholestase. Die Gallengangligatur (GGL) dient der Erforschung von molekularen Mechanismen einer obstruktiven Cholestase. Die Regulation der jeweiligen hepatischen Transporterproteine ist abhängig von dem Cholestasemodell und zeigt einerseits deutliche Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten zwischen den Modellen.

Im Modell der inflammatorischen Cholestase, wie sie bei einer Sepsis auftreten kann, wird Lipopolysacharid (LPS) appliziert, das eine proinflammatorische Reaktion der Kupferzellen mit Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  auslöst (Trauner et al., 1999; Wagner und Trauner, 2005). Die Gabe von LPS führt zu einer Herabregulation von basolateralen und apikalen Transportern. NTCP wird RXR:RAR-abhängig transkriptionell stark herabreguliert (Green et al., 1996; Trauner et al., 1998). Desweiteren ist die Expression von Oatp1a1, 1a4 und 1b2 reduziert. Bei den apikalen Transportern findet eine posttranskriptionelle und transkriptionelle Regulation von Mrp2 und Bsep in Immunfluoreszenzschnitten statt (Trauner et al., 1997; Mühlfeld et al., 2003). Bsep wird selektiv in periportalen Hepatozyten herabreguliert (Donner et al., 2007).

In der Schwangerschaft beeinflussen veränderte Östrogen- und Progesteronspiegel die Transporterexpression in der Leber (Geier et al., 2007). Durch Ethinylestradiolgaben im Tiermodell können die Expression und Funktion hepatobiliärer Transporter analog zu hormonellen Einflüssen im Rahmen der Schwangerschaft charakterisiert werden. Im Rattenmodell konnte eine deutlich reduzierte Expression von Ntcp gezeigt werden (Simon et al., 2004). Die Transporter der Oatp-Familie, Oatp1a1, 1a4 und 1b2 hingegen werden nur geringfügig herabreguliert (Simon et al., 1999; Cao et al., 2001; Geier et al.,

2003). Die Expression von Bsep und Mrp2 wird durch Ethinylestradiol signifikant herabreguliert, sodass es unter Einfluss von Ethinylestradiol auch zu einer funktionellen Einschränkung der hepatobiliären Sekretion kommt (Lee et al., 2000; Cao et al., 2002).

Die Gallengangsligatur bei der Ratte stellt das experimentelle Modell für die obstruktive Cholestase dar. Bei obstruktiver Cholestase wird der basolaterale Ntcp-Transporter und Oatp1a1 zytokinunabhängig herabreguliert (Gartung et al., 1996; Gartung et al., 1997; Geier et al., 2005; Donner et al., 2007). Oatp1a4 und Oatp1b2 werden zonal induziert (Donner et al., 2007). Bei den apikalen Transportern wird Mrp2 durch IL-1 $\beta$  herabreguliert (Trauner et al., 1997; Denson et al., 2000). Die Bsep-Expression wird selektiv in periportalen Hepatozyten herabreguliert. Die posttranskriptionelle Regulation wird durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermittelt (Donner et al., 2007).

#### 1.4.3 Leberschädigung bei Ischämie und Reperfusion

Leberschädigung durch Ischämie und Reperfusion ist eine klinisch bedeutsame Komplikation in der Leberchirurgie. Der Reperfusionsschaden kann auftreten bei operativen Eingriffen an der Leber, bei Lebertransplantation, sowie im Rahmen verminderter Leberperfusion z.B. im Rahmen einer verminderten Blutzirkulation bei Kreislaufschock. Die Funktion eines Lebertransplantats kann durch eine ischämie- und reperfusionsassoziierte Cholestase beeinträchtigt werden (Fusai et al., 2006; Guan et al., 2014). Ischämie- und Reperfusionsschäden sind assoziiert mit erhöhten Abstoßungsraten bei Lebertransplantationen (Howard et al., 1990; Fellström et al., 1998). Eine postoperative Cholestase nach Lebertransplantation geht mit einer erhöhten Mortalität des Transplantatempfängers einher (Fusai et al., 2006).

Klinisch unterscheidet man die kalte Ischämie und Reperfusion, die bei Transplantationen auftritt und die warme Ischämie und Reperfusion, wie sie bei Leberoperationen und bei hypovolämen Schock bspw. auftritt (Jaeschke, 1998; Fondevila et al., 2003).

Während der Ischämiephase kommt es zur intrazellulären Depletion von ATP durch die anaerobe Stoffwechsellage, sowie zu einer verminderten Aktivität der oxidativen Phosphorylierung. Dies führt somit konsekutiv zur Akkumulation von sauren Stoffwechselprodukten, die zur metabolischen Azidose führen (Guan et al., 2014). Es kommt zu mitochondrialen und zellulären Schäden (Siriusawakul et al., 2010). Die Ischämiephase führt zu vermehrter Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran für reaktive Sauerstoffspezies (Bernardi et al., 1994) und führt zu hepatozellulärem Schaden (Sastre et al., 2003; Abu-Amara et al., 2010). Kupffer-Zellen schütten IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , sowie NO und Prostaglandine aus (Jaeschke and Farhood, 1991; Wanner et al., 1996), die zu einer hepatozellulären Schädigung beitragen.

Die Arbeitsgruppe von Tanaka zeigte, dass nach warmer Ischämie und Reperfusion Mrp2 in der Leber herabreguliert wird und in der Niere hochreguliert wird (Tanaka et al., 2008). Desweiteren zeigte die selbe Arbeitsgruppe, dass die mRNA-Expression der basolateralen Transporter Oatp1a1, 1a4 und 1b2 und Ntcp, sowie die mRNA Expression von Bsep verringert sind (Tanaka et al., 2006).

#### 1.4.4 Cholestase bei warmer Ischämie und Reperfusion

Warme Ischämie und Reperfusion tritt in erster Linie nach Leberteilresektion auf (Teoh und Farrell, 2003). Weiterhin findet eine Ischämie- und eine Reperusionsphase bei hypovolämen Schock statt (Teoh und Farrell, 2003). Die Schädigung der Leber bei warmer Ischämie und Reperfusion kann in zwei Phasen eingeteilt werden (Teoh und Farrell, 2003). In der Frühphase, bis zu zwei Stunden nach Reperfusion, kommt es zu oxidativem Stress, der zu einer hepatozellulären Schädigung führt (Teoh und Farrell, 2003). Außerdem tritt eine Aktivierung des Komplementsystems und von Kupfferzellen auf (Jaeschke und Farhood, 1991; Jaeschke et al., 1993). Die folgende, zweite Phase 6-48 Stunden nach Reperfusion wird durch die inflammatorische Antwort von neutrophilen Granulozyten unterhalten, die neben zytotoxischen Enzymen (z.B. Elastase, Heparinase, Kathepsin G) auch durch oxidativen Stress Hepatozyten schädigen (Teoh und Farrell, 2003).

In der Frühphase der warmen Ischämie kommt es zur intrazellulären Akkumulation von sauren Stoffwechselprodukten. Es kommt konsekutiv zur Leberzellschädigung, wenn die Reperfusion in der Phase einer Regulation der Azidose erfolgt (Gores et al., 1989; Currin et al., 1991).

Die Atmungskette und Oxidasen des Cytochrom P450 Enzymsystems in der Leber sind hauptsächlich für die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich (Teoh und Farrell, 2003).

In der Reperfusionsphase werden im Tiermodell vermehrt TNF- $\alpha$  und konsekutiv vermehrt IL1- $\beta$  gebildet. Ferner wird zeitversetzt IL-6 gebildet. TNF- $\alpha$  stimuliert die Kupfferzellantwort und fördert somit nochmals seine eigene Bildung durch Kupfferzellen (Wanner et al., 1996; Teoh und Farrell, 2003). Die pharmakologische Hemmung von TNF- $\alpha$  kann den Schaden nach Ischämie und Reperfusion im Tierexperiment mindern (Coletti et al 1990; Rüdiger und Clavien, 2002; Teoh und Farrell, 2003).

Im weiteren Verlauf werden endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 oder P-Selektin hochreguliert, die durch Vermittlung von Adhäsion und Extravasation eine Migration von neutrophilen Granulozyten verursachen (Nakano et al., 1995; Yadav et al., 1998).

Es wird vermutet, dass nur ein kleiner Teil des hepatozellulären Schadens bei Ischämie und Reperfusion durch Apoptose ausgelöst wird sondern vorwiegend durch Nekrose (Gujral et al., 2001).

Nach Ischämie und Reperfusion kann eine klinisch relevante Cholestase auftreten (Ban et al., 2009). Bei lebertransplantierten Patienten führt dies zu einer erhöhten postoperativen Mortalität gegenüber nicht-cholestatischen Patienten (Fusai et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Mrp2 im Tiermodell nach warmer Ischämie und Reperfusion endozytiert wird und hierdurch eine Cholestase induzieren kann (Ban et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Accatino zeigte Anstiege der Serumkonzentration von Gallensalzen nach warmer Ischämie und Reperfusion, was wiederum auf eine veränderte Funktion der kanalikulären Gallensalzsekretion schließen lässt (Accatino et al., 2003). Desweiteren ist die mRNA-Expression nach warmer

Ischämie und Reperfusion von Mrp2, Bsep, Oatp1a1, 1b2 und 1a4 reduziert (Tanaka et al., 2006).

### 1.5 Taurin: Wirkung und Bedeutung bei Lebererkrankungen

Taurin ist eine schwefelhaltige  $\beta$ -Aminosäure. Sie wird nach *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* auch als 2-Aminoethansulfonsäure bezeichnet. Taurin ist eine nicht-essentielle Aminosäure des menschlichen Körpers und wirkt als Osmolyt, (Zhang et al., 1996; Warskulat et al., 1997) Radikalfänger (Huxtable, 1996; Atmaca, 2004) Membranstabilisator, Wachstumsregulator, Apoptosemodulator und beteiligt sich an der Konjugation von Gallensäuren (Redmond et al., 1998).

Eine Tauringabe bei Kindern, die an zystischer Fibrose erkrankt sind, kann eine Steatorrhoe vermindern (Birdsall, 1998). Eine Tauringabe hat positive Effekte bei Retinopathien (Froger et al., 2014). Orale Tauringaben können die Folgen einer chronischen Herzinsuffizienz abschwächen (Ito et al., 2014).

Taurin wird ferner eine hepatoprotektive Funktion bei Leberschäden zugeschrieben. In einer Studie wurde ein verbessertes Transplantatüberleben und ein verminderter Leberschaden in einem Lebertransplantationsmodell gezeigt (Schemmer et al., 2005). Die Arbeitsgruppe von Seabra konnte eine verminderte Expression von TNF- $\alpha$  zeigen, die einhergehend mit einer Verminderung des endotoxinabhängigen Leberschadens assoziiert ist (Seabra et al., 1998).

Wettstein und Häussinger (Wettstein und Häussinger, 1997) zeigten, dass eine Tauringabe vor warmer Ischämie und Reperfusion den Leberschaden und die Expression von TNF- $\alpha$  reduziert. Dies weist darauf hin, dass Taurin eine hepatoprotektive Funktion über die Inhibition der Aktivierung von Kupferzellen ausübt (Wettstein und Häussinger, 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass eine orale Tauringabe in einem LPS-induzierten Cholestasemodell die Mrp2- und Bsep-mRNA-Expression größtenteils wiederherstellen kann (Mühlfeld et al., 2003).

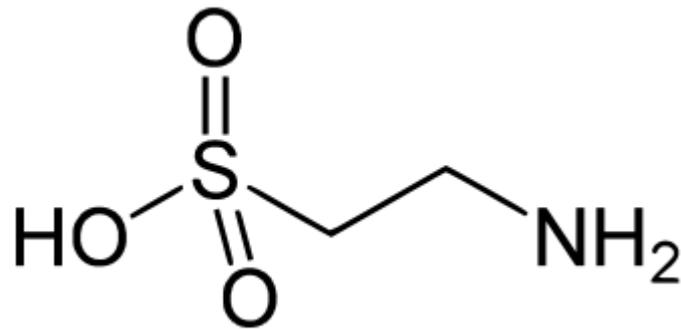


Abb. 2: Strukturformel der Aminosäure Taurin (2-Aminoethansulfonsäure), modifiziert nach Huxtable *Physiological Reviews* Vol. 72, No. 1, January 1992

## 1.6 Ischämische Präkonditionierung

Das Ziel der ischämischen Präkonditionierung (IPC) ist eine Verminderung eines ischämieassoziierten Schadens durch eine vorangehende Phase kurzer Ischämie.

Erste Tierversuche, die eine ischämische Präkonditionierung beinhalten, zeigten eine Reduktion von Infarktarealen am Herzen. Eine ischämische Präkonditionierung am Herz von viermal fünf Minuten gefolgt von 40 Minuten Ischämie kann das Infarktareal im Tierversuch minimieren (Murry et al., 1986). Weitere Studien in unterschiedlichen Tiermodellen zeigen ähnliche Effekte. Die ischämische Präkonditionierung führt am Herz zu einer Freisetzung von Bradykinin und Adenosin, die G-Protein-gekoppelte Kinasen ("*Extracellular-signal Regulated Kinases*" 1 und 2, sowie Phosphatidylinositol-3-Kinase) aktivieren und zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies führen, welche weitere Signalkaskaden aktivieren (Yellon und Hausenloy, 2005).

Verschiedene Studien zeigten, dass eine ischämische Präkonditionierung an weiteren Organen Infarktareale vermindern kann.

Eine ischämische Präkonditionierung (jeweils dreimal 10 Minuten IPC gefolgt von vier Stunden Ischämie und 48 Stunden Reperfusion) am Skelettmuskel vermindert dessen Infarktgröße (Pang et al., 1995). Eine ischämische

Präkonditionierung des Auges reduziert den Ischämie- und Reperfusionsschaden an der Retina (Roth et al., 1998).

In der Leber führt eine ischämische Präkonditionierung am Tiermodell zur einer Reduktion der Sterblichkeit, reduziert sinusoidale und hepatozelluläre Apoptose und vermindert die Caspaseaktivität und das mit Apoptose assoziierte Protein "B-cell-Lymphoma-2" (Bcl-2) (Yadav et al., 1999). In einer Studie an 100 Patienten, an denen eine Leberteileresektion vorgenommen wurde bewirkt eine ischämische Präkonditionierung (10 Minuten Ischämie und Reperfusion) eine Reduktion der GOT und GPT im Serum (Clavien et al., 2003). Ischämische Präkonditionierung steigert das Transplantatüberleben nach orthotoper Lebertransplantation im Tiermodell (Currin et al., 2012).

## 1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Schädigung von Organen durch warme Ischämie und Reperfusion stellt ein zentrales, klinisches Problem im Rahmen von vaskulären Erkrankungen und Operationen dar. So kann es zu warmer Ischämie und Reperfusion im Zuge von Operationen kommen, in denen die Blutversorgung eines Organes zeitweilig unterbrochen ist, ferner bei hypovolämen Schock und ebenso bei thrombotischen Ereignissen (Teoh und Farrell, 2003).

Die warme Ischämie und Reperfusion führt zu einer Kupffer-Zell Antwort, mit gesteigerter Expression von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6, erhöhter Expression von Zelladhäsionsmolekülen und erhöhtem oxidativem Stress (Teoh und Farrell, 2003; Guan et al., 2014). Mrp2 wird im Tiermodell nach warmer Ischämie und Reperfusion endozytiert. Dies zeigt, dass der warme Ischämie- und Reperfusionsschaden eine Auswirkung auf die Verteilung der hepatischen Transportproteine hat (Coletti et al., 1990; Teoh und Farrell, 2003). Die Kurzzeitregulation weiterer hepatobiliärer Transporter, sowie deren zonale Regulation in der Leber nach warmer Ischämie und Reperfusion wurde bisher nicht untersucht.

Taurin ist in der Lage, den Leberschaden nach warmer Ischämie und Reperfusion zu mindern und die Kupfferzellantwort zu beeinflussen (Kincius et al., 2007). Die Expression von TNF- $\alpha$  kann im Tiermodell nach LPS-Gabe und Präkonditionierung mit Taurin vermindert werden (Seabra et al., 1998). Desweiteren ist Taurin in der Lage, im Tiermodell eine endotoxinabhängige Herabregulation der apikalen, hepatischen Transporter Mrp2 und Bsep teilweise aufzuheben (Wettstein und Häussinger, 1997; Mühlfeld et al., 2003).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Wie werden hepatobiliäre Transportproteine nach einer Phase von warmer Ischämie und Reperfusion in einem Rattenlebermodell von einer Stunde Ischämie gefolgt von einer Stunde Reperfusion reguliert?
2. Wie ist die lobuläre Expression der hepatischen Transportproteine nach warmer Ischämie und Reperfusion im o.g. Modell?
3. Kann die Expression hepatischer Transportproteine durch die Gabe der Aminosäure Taurin vor warmer Ischämie und Reperfusion beeinflusst werden?
4. Kann die Expression hepatischer Transportproteine durch eine pharmakologische Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL1- $\beta$  beeinflusst werden?
5. Wie wirkt sich eine ischämische Präkonditionierung auf die Expression hepatischer Transportproteine aus?

## 2. Material

### 2.1 Geräte

Tab.1:

Blottingkammer; Fastblot B33/34	Biometra, Göttingen (D)
Elektrophoresekammer, Z37, 507-1	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Filmentwickler, Curix 60	AGFA, Köln (D)
Feinwaage, BP 1200	Sartorius, Göttingen (D)
Inkubationsstation, SlideBooster SB 450	Advalytix AG, München (D)
Kryotom, Leica CM 1950	Leica, Wetzlar (D)
Laserscanningmikroskop, LSM 510	Zeiss, Jena (D)
Magnetrührer, IkaMag RCT	Ika Labortechnik, Staufen (D)
Multiscan Spektrum	Thermo Scientific (USA)
Objektträgerzentrifuge, Slide Spinner	Neolab, Heidelberg (D)
Photometer, Ultrospec 2100 pro	Biochrom LTD., Cambridge (GB)
pH-Meter, Inolab pH Level 1	WTW, Weilheim (D)
Scanner Epson Perfection 4990 Photo	Epson Deutschland, Meerbusch (D)
Schüttler, KS 250 basic	Ika Labortechnik, Staufen (D)
Kodak Molecular Imaging Software Ver. 4.0.5	Kodak GmbH, Stuttgart (D)
Spannungsquelle, Power-Supply EPS 600 + 304	Amersham Pharmacia Biotech / GE Healthcare, Solingen (D)
Thermomixer, Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg (D)
Bandelin Sonopuls HD 3100	Bandelin Electronics, Berlin (D)
Ultrazentrifuge, Beckmann Coulter TL-100	Beckmann, Krefeld (D)
Vortexgerät Labinco L46	Labinco BV, Breda (NL)
Zentrifuge, Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg (D)

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 2:

Acrylamid 4K-Lösung 30% Mix 29:1	Applichem, Darmstadt (D)
Antibody Stripping Solution Strong; Re Blot Plus	Chemikon (USA)
Ankoppelungsflüssigkeit, AdvaSon AS 100	Advalytix AG, München (D)
Bromphenolblau	BIO RAD, München (D)
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe (D)
ECL Western Blotting Detektionssystem	Perkin Elmer Lifesciences, Boston (USA)
Einbettmedium, Tissue Tek	Sakura Finetek Europe; Zoeterwoude (NL)
ELISA-KIT, Quantikine Rat TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6	R & D Systems, (USA)
Filterpapier	Whatman, Maidstone (GB)
Flourescence-Mountingmedium	Dako, Carpinteria (USA)
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech / GE Healthcare, Solingen (D)
Marker; Precision Plus Protein Standards Dual Color	BIO RAD, München (D)
Objektträger	Engelbrech, Medizin- und Labortechnik, Ebermünde (D)
Phosphate-Buffered-Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin (D)
Proteinaseinhibitorcocktail Complete	Roche, Mannheim (D)
Protein Assay; Bio Rad	BIO RAD, München (D)
Transfermembran PVDF Hybond P	Amersham Pharmacia Biotech / GE Healthcare, Solingen (D)
Triton X-100	Merck, Darmstadt (D)

Weitere Chemikalien, die nicht aufgeführt wurden, entsprechen der höchsten zu erwerbenden Reinheit und wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, D) oder Merck (Darmstadt, D) bezogen.

### 2.3 Lösungen und Puffer

APS: Ammoniumperoxodisulfat 10% in Aqua dest.

Blockierungs-Lösung: 5% BSA in TBS-T

Auftragungspuffer: WB 2 x SDS

Tab. 3:

Tris/HCl pH 6,8	220 mM
SDS	9 %
Glyzerin	40 %
Bromphenolblau	0,125 %
DTT	1 M

### Blotting-Puffer

Tab. 4:

	Anode I	Anode II	Kathode
TRIS	0,3 M	0,025 M	
Methanol	20%	20%	20%
M-Aminohexansäure			0,04 M

### Elektrophoresepuffer

Tab. 5:

Tris	25 mM
SDS	4 mM
Glycin	250 mM

Lysis-Puffer für ELISA

Tab. 6:

PBS	Nach gewünschtem Gesamtvolumen
Natriumazid	0,05 %
Triton X-100	0,5 %
Roche Proteinaseinhibitor	2 Tabletten
pH	7,2

HN-Puffer

Tab. 7:

Tris/HCl pH 7,6	10 mM
Sucrose	250 mM

RL-Lysis-Puffer

Tab. 8:

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	140 mM
NaF	10 mM
Natriumpyrophosphat x 10 H <sub>2</sub> O	10 mM
Triton X-100	1 %
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Natriumorthovanadat	1 mM
β-Glycerophosphat	20 mM

TBS-T

Tab. 9:

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	150 mM
Tween	0,1 %

## 2.4 Antikörper

## 2.4.1 Primärantikörper

Tab. 10:

Antigen	Name, Art und Ursprung	Referenz	Verdünnung (IF / WB)
$\beta$ -Actin	Monoklonal; Maus	Abcam, Cambridge (GB)	- / 1:10000
Mrp2	EAG 15; polyklonal; Kaninchen	Prof. Dr. V. Keitel, Universitätsklinikum Düsseldorf (D)	- / 1:2000
Mrp2	EAG 15.4; polyklonal; Kaninchen	Prof. Dr. D. Keppler DKFZ Heidelberg (D)	1:200 / -
Ntcp	K4; polyklonal; Kaninchen	Prof. Dr. B. Stieger, Zürich (CH)	1:200 / 1:3000
Oatp1a1	K10; polyklonal; Kaninchen	Prof. Dr. B. Stieger, Zürich (CH)	1:200 / 1:3000
Oatp1b2	K15; polyklonal; Kaninchen	Prof. Dr. B. Stieger, Zürich (CH)	1:200 / 1:3000
Oatp1a4	K22; polyklonal;	Prof. Dr. B. Stieger, Zürich (CH)	1:200 / 1:3000

	Kaninchen		
Bsep	K44; polyklonal; Kaninchen	Prof. Dr. B. Stieger, Zürich (CH)	1:200 / 1:5000
Glutaminsynthetase	monoklonal; Maus	BD Bioscience Heidelberg (D)	1:200 / -
ZO-1	monoklonal; Maus	Merck Millipore Billerica (USA)	1:300 / -

## 2.4.2

## Sekundärantikörper

Tab.11:

Name, Art und Ursprung	Referenz	Verdünnung (IF / WB)
Cy-3 gekoppelter goat anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg (D)	1:200 / -
Alexa 488 konj. goat anti-mouse IgG	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:500 / -
HRP-gekoppelter goat anti-mouse	Dako, Carpinteria (USA)	- / je nach Konzentration von Erstantikörper
HRP-gekoppelter goat anti-rabbit	Dako, Carpinteria (USA)	- / je nach Konzentration von Erstantikörper

### 3. Methoden

#### 3.1 Histologische Methoden

##### 3.1.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich Epitope eines Antigens auf Gewebe oder Zellen darstellen. Dabei wurde ein Erstantikörper genutzt, um ein Antigen (Protein oder ein Makromolekül) zu markieren. Erstantikörper können monoklonaler oder polyklonaler Herkunft sein. Monoklonale Antikörper werden in einheitlichen B-Zell-Klonen hergestellt, die später mit Myelomzellen fusioniert werden und somit kontinuierlich den selben Antikörper herstellen. Polyklonale Antikörper werden in unterschiedlichen B-Zellen hergestellt und differieren leicht in ihrer Reaktivität gegen verschiedene Epitope eines Antigens.

Zur Detektion des Erstantikörper wurde ein Zweitantikörper zugegeben, der mit dem Fc-Fragment des Erstantikörpers reagiert. Dieser Zweitantikörper ist gekoppelt an ein farbstofftragendes Substrat, welches nach erfolgter Bindungsreaktion durch Licht angeregt werden kann und somit das gesuchte Antigen sichtbar macht.

##### 3.1.2 Herstellung der Gewebeschnitte mit dem Kryotom

Die zu untersuchenden Rattenleberfragmente wurden in einem Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Rattenleberfragmente wurden auf dem Weg zum Kryotom in flüssigem Stickstoff überführt. Die Arbeitskammer des Kryotomes wurde immer bei  $-16^{\circ}\text{C}$  gehalten. Ebenso wurde die Temperatur des Arbeitstisches auf  $-16^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Die Schnittdicke wurde auf  $6\ \mu\text{m}$  eingestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Schnitte ähnlicher Größe auf den Objektträger aufgezogen.

Die angefertigten Schnitte wurden an der Raumluft ca. 30 Minuten getrocknet und danach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

### 3.1.3 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte

Die Objektträger wurden direkt aus dem Gefrierschrank für fünf Minuten in – 20°C kaltes Methanol überführt. Danach wurden die Objektträger mit PBS für wenige Sekunden gewaschen. Daran schlossen sich drei weitere Waschgänge mit PBS zu je 10 Minuten an. Die Objektträger wurden danach für 10 Minuten in mit 2%iger FCS/PBS Lösung getaucht, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Auf jeden Objektträger wurden 200 µl Erstantikörper, welcher in 2%iger FCS/PBS Lösung verdünnt ist, aufgetragen und die Erstantikörperlösung wurde gleichmäßig über dem Objektträger mittels Schwenken des Objektträgers verteilt. Nun wurden die Objektträger in die Halterungen des Slide Boosters überführt. Dort wurden die Objektträger bei 28 °C konstant für zwei Stunden inkubiert. Es folgten drei Waschgänge in PBS für je 10 Minuten. Darauf wurden die Objektträger, analog zum Vorgehen beim Erstantikörper, mit einem Zweitantikörper bei 37° C konstant für 30 Minuten inkubiert. Erneut folgten drei Waschgänge zu je 10 Minuten in PBS. Die fertiggefärbten Objektträger wurden in Aqua dest. geschwenkt, mit "*Mounting Medium*" versehen und eingedeckelt. Bis zur konfokalen Laserscanningmikroskopie wurden die Objektträger im Kühlraum bei + 4°C lichtgeschützt gelagert.

### 3.1.4 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Zur Lokalisation und lobulären Expression hepatobiliärer Transporter und zu deren Auswertung wurden die Gewebsschnitte mittels Laserscanningmikroskop analysiert. Die benutzten Zweitantikörper wurden mit Licht der Wellenlänge 488 nm zur Detektion von Grünfluoreszenz und mit Licht der Wellenlänge 568 nm zur Detektion von Rotfluoreszenz angeregt. Verglichen wurden jeweils Präparate auf dem selben Objektträger. Bilder wurden mit dem selben Objektiv, den selben Scanningeinstellungen, identischem Format, identischem Zoom und identischer Schichtdicke angefertigt.

### 3.1.5 Densitometrische Auswertung von Immunfluoreszenzen

Von insgesamt 24 Präparaten (n=4/Gruppe) auf 2 Objektträgern wurden Aufnahmen mit dem 20 x Objektiv angefertigt. Detailaufnahmen wurden mit dem 64x Objektiv angefertigt (vgl. Abbildungen 15,16). Die Kennzeichnung der Proben war verschlüsselt, sodass eine verblindete Auswertung möglich war. Für jede Antikörperfärbung wurden geeignete Einstellungen gewählt und alle Aufnahmen wie o.g. ausgeführt. Die Bilder zeigten immer einen Lobulus mit einem Periportalfeld und einer Zentralvene. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der zugehörigen Software des LSM. Dabei wurde ein Cursor von vergleichbarer Länge über die kanalikuläre Membran bzw. über die basolaterale Domäne gelegt. Die maximale Intensität (gemessen in dimensionslosen Einheiten), sowie die maximale Hintergrundintensität wurden gemessen und notiert. Jeweils zehn Messungen wurden an Hepatozyten um die Zentralvene durchgeführt und zehn weitere Messungen an periportal Hepatozyten an jeweils repräsentativen Membranen. Die maximale Intensität wurde von der Hintergrundintensität subtrahiert und in ein Microsoft Excel Datenblatt übertragen.

Die Auswertung der verblindet erhobenen Daten erfolgte durch Dr. med. Sebastian Braun, Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf.

Die Ergebnisse als Prozentangaben beziehen sich auf das Ergebnis der Densitometrie von den perizentralen Hepatozyten der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Densitometrieergebnisse der Kontrolltiere wurde errechnet und als 100% gesetzt. Die Prozentangaben aller anderen Gruppen orientieren sich somit an der Kontrollgruppe.

## 3.2 Proteinanalytische Methoden

### 3.2.1 Gesamtmembranpräparation aus einem Leberpräparat

Ein Aliquot eines Rattenleberpräparats von ca. 0,5 cm Kantenlänge wurde mit 1000 µl, 4° C kaltem HN-Puffer versehen und taute darin auf. Ein Aliquot des HN-Puffers wurde mit zwei Tabletten Complete Proteinase-Puffer versehen. Um die Leberstücke zu homogenisieren, wurden sie mit dem HN-Puffer in ein

geeignetes, eisgekühltes Gefäß überführt und mit einem Teflon-Homogenisator bei ca. 500 U/min innerhalb eines Eisbades zerkleinert. Die homogenisierten Leberpräparate wurden in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und auf der Feinwaage genau abgewogen. Es schloß sich eine Ultrazentrifugation in einer Zentrifuge vom Typ Beckmann Coulter TL-100, Fa. Beckmann, Krefeld bei 100000 g (dies entspricht 55000 U/min) an. Die Proben wurden für 60 Minuten zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand, der der zytosolischen Fraktion entspricht, abpipettiert, aliquotiert und eingefroren. Die Pellets wurden sofort mit 1000µl, 4°C kaltem RL-Lysis-Puffer versehen. Die Pellets wurden nun mit einer sauberen Pipettenspitze vom Boden des Ultrazentrifugenröhrchens gelöst. Die Pelletpuffergemische wurden in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und mit einem Ultraschallhomogenisator für zehn Sekunden bei 4°C homogenisiert. Dieser Arbeitsschritt wurde dreimal wiederholt, bis die Präparate vollständig homogenisiert waren. Die Homogenate wurden nun bei 13000 U/min herunterzentrifugiert und bei – 20° C gelagert.

### 3.2.2 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Der Proteingehalt der Rattenleberhomogenate wurde mittels des Bradford-Tests ermittelt (Bradford, 1976). Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bindet ein Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G 250) an Proteine und bildet mit ihnen einen Komplex aus. Somit verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 470 nm, in seiner ungebundenen Form, zu 595 nm in seiner komplexierten Form. Es wurde 1/5 Bradford-Lösung zu 4/5 Aqua dest. zugegeben. Es wurden 995 µl des o.g. Bradfordansatzes mit 5 µl des zuvor 1:10 mit RL-Puffer verdünnten Leberhomogenisates versetzt und in eine Küvette überführt. Der Nullwert wurde bestimmt mittels einer Küvette, welche mit 995 µl Bradfordansatz und 5 µl RL-Puffer versehen war. Die gemessene Extinktion wurde mit einem gerätespezifischen Eichfaktor multipliziert und notiert. Daraus ließ sich die Proteinmenge in µg/µl berechnen.

## 3.2.3

## SDS-PAGE

Die Rattenleberhomogenate wurden für die Gelelektrophorese aliquotiert. Jede Tasche des Gels wurde mit 50 µg Protein beladen. Die Proben wurden mit 2x SDS Ladungspuffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt. Die Proben wurden am Vortag der Gelelektrophorese bei 37° C für 30 Minuten inkubiert und über Nacht bei -20° C gelagert. Das Elektrophoresegel bestand aus zwei Anteilen, einem Sammelgel und dem Trenngel. Die Gele wurden vertikal angeordnet. Die Konzentration des Trenngels war abhängig von der zugegebenen Menge von Acrylamid und richtete sich nach der Größe des zu detektierenden Proteins. Das Sammelgel wurde stets in der selben Acrylamidkonzentration von 5% benutzt. Gemäß der u.g. Tabellen wurde dem Gel ein definierter Anteil Aqua dest., Acrylamid, Tris-Puffer (pH 6,8) und SDS zugefügt. Die Polymerisierung des Gels wurde durch Ammoniumpersulfat eingeleitet und durch Tetramethylethyldiamin katalysiert. Etwa 20 Minuten später war das Gel polymerisiert. Nachdem die Proben mit der Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels aufgetragen worden waren, wurde neben den Proben ein Proteinstandard in zwei der Taschen des Gels zugegeben. Die Proben liefen bei einer Spannung von 120 V für 30 Minuten ein. Danach wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Die Elektrophorese lief nun weitere drei bis vier Stunden, abhängig von der Konzentration des Gels. Das Gel konnte nun für einen Proteintransfer i.S. eines Western Blots benutzt werden.

## 3.2.4

## Sammelgel

Polyacrylamid-Sammelgel (5%)

Tab. 12:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	13,6 ml
30% Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	3,4 ml
1 M TRIS / HCl pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	200 µl

10 % APS	200 µl
TEMED	20µl

## 3.2.5

## Trenngele

## Polyacrylamid-Trenngel (5%)

Tab. 13:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	13,6 ml
30% Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	3,4 ml
1,5 M TRIS / HCl pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	200 µl
10 % APS	200 µl
TEMED	20 µl

## Polyacrylamid-Trenngel (7,5%)

Tab. 14:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	4,8 ml
30% Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	2,5 ml
1,5 M TRIS / HCl pH 8,8	2,8 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	8,0 µl

## Polyacrylamid-Trenngel (10%)

Tab. 15:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	4,0 ml

30% Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	3,4 ml
1,5 M TRIS / HCl pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	4,0 µl

### Polyacrylamid-Trenngel (12%)

Tab. 16:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	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	4,0 µl

### Polyacrylamid-Trenngel (15%)

Tab. 17:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	2,3 ml
30% Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	5,0 ml
1,5 M TRIS / HCl pH 8,8	2,5ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	4,0 µl

## 3.2.6

## Immunoblot

Bei der Immunoblotmethode (Western Blot) wurde das fertig elektrophoretisch aufgetrennte Rattenleberhomogenat auf eine Membran aus Nitrocellulose oder PVDF (Polyvinylidenfluorid) übertragen. Dazu nutzt man ein elektrisches Feld,

welches die Proteine auf dem Agarosegel mobilisiert. Die Proteine, die sich zuvor im elektrischen Feld der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgeteilt hatten, wurden hierbei auf die Membran transferiert. Die geblottete Membran ließ sich nun weiterverarbeiten und erlaubte eine Detektion der Proteine mittels Chemolumineszenz und Belichtung eines Films.

### 3.2.7 Proteintransfer

Der Proteintransfer wurde in speziellen Blottingkammern durchgeführt. Dazu wurden mehrere Schichten, in Puffer getränktes Whatman-Filterpapier, sowie das Agarosegel und die Membran in Schichten ausgelegt. Die Blottingapparatur wurde geschlossen und mit einem Bleigewicht beschwert. Nun wurde der Transfer mit einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  durchgeführt. Dabei wanderten die Proteine vertikal vom Agarosegel zur daruntergelegenen Membran. Zu unterst wurden fünf Lagen Whatman-Filterpapier gelegt, die in Anode-I-Puffer getränkt waren. Darauf folgten drei Lagen Whatman-Filterpapier, die in Anode-II-Puffer getränkt waren. Im nächsten Schritt folgte die Transfermembran. In dieser Arbeit wurden ausschließlich PVDF-Transfermembranen verwendet. Es folgten das Agarosegel und darauf wiederum fünf Lagen in Kathode-Puffer getränktes Whatman-Filterpapier. Bei der Schichtung wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden. Der Transfer dauerte 90 Min. – 120 Min., abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine. Das Vorgehen entsprach der sogenannten "*Semi-Dry*"-Methode. Nach Abschluss der Transferprozedur wurde die Membran zugeschnitten, dreimal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen und danach für eine halbe Stunde in TBS-T-Lösung, versehen mit 5% BSA bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, welcher in 3%iger BSA/TBS-T Lösung gelöst war. Membran und Antikörperlösung wurden dazu in einen verschraubbaren Glaszylinder gegeben, auf einen Rollschüttler gelegt und bei  $4^\circ \text{ C}$  inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Erstantikörperlösung entfernt und es schloß sich ein Waschvorgang von dreimal 30 Min. in TBS-T an. Der Zweitantikörper wurde in TBS-T Lösung mit 3% BSA zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschvorgang von drei Mal 30 Min. in TBS-T. Die Membran wurde jetzt für zwei Minuten mit ECL-Lösung versehen, für den späteren nicht-radioaktiven Nachweis der Proteine. Dabei

wurde ein Röntgenfilm über die auf der Membran befindlichen Proteinbanden gelegt. Durch eine Chemilumineszenzreaktion wurde der Röntgenfilm an den entsprechenden Stellen belichtet ( $\lambda = 428 \text{ nm}$ ) und somit geschwärzt. Man machte man sich hierbei zu Nutze, dass die zwei Komponenten der ECL-Lösung, den Farbstoff Luminol mit Hilfe von Wasserstoffperoxid, welches reduziert wurde, oxidieren.

### 3.2.8 Auswertung des Immunoblot

Zur Auswertung der Immunoblots wurde der belichtete Hyperfilm mittels eines Scanners Typ Epson Perfection 4990 Photo, bei einer Auflösung von 600 dpi aufgenommen. Die im TIF-Dateiformat abgespeicherten Bilder wurden nun mit der Software Kodak Molecular Imaging Software Ver. 4.0.5 der Firma Kodak USA ausgewertet. Dabei wurden die im Bild dargestellten, geschwärzten Areale der Proteinbanden mittels eines Softwaretools markiert. Zusätzlich wurden insgesamt vier Areale außerhalb der geschwärzten Bereiche im Bild des Hyperfilms ausgemessen, um den Einfluss einer Hintergrundbelichtung des Films zu eliminieren. Die gemessenen Werte der Proteinbanden des gesuchten Antigens, wurden zum Wert der dazugehörigen Beladungskontrolle in Beziehung gesetzt und somit ein Quotient gebildet. Nach Densitometrie der zu einer Gruppe zugehörigen Areale wurde der Mittelwert gebildet und schließlich der Quotient zur Kontrollgruppe ausgerechnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mit Hilfe des Mann-Whitney- U-Test bestimmt.

### 3.3 ELISA

#### 3.3.1 Anfertigung von Lysaten für ELISA

Ein Aliquot eines Rattenleberpräparats wurde im Kryotom ausgesucht und in ein separates Eppendorfgefäß bei  $-15^{\circ}\text{C}$  überführt. Zur besseren Handhabung wurden in etwa gleichgroße Leberstücke von ca. 0,5 cm Kantenlänge ausgesucht. Die Leberstücke wurden in Lysispuffer für ELISA aufgenommen. Um die Leberstücke in Lösung zu bringen, wurden sie mit dem Lysispuffer in ein geeignetes, eisgekühltes Gefäß überführt und mit einem Teflon-Homogenisator bei ca. 500 U/min innerhalb eines Eisbades zerkleinert. Dabei wurde der Teflonhomogenisator im Gefäß nur wenig auf- und abbewegt, um ein Aufschäumen des Probenpuffergemisches zu verhindern. Die Homogenate wurden bei 12000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse gelagert.

#### 3.3.2 Durchführung des ELISA

Die Analyse der o.g. Lysate wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers der ELISA-Kits vorgenommen.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben wurden auf Eis gekühlt. Die Wellplatte wurde vorbereitet und jeweils 50  $\mu\text{l}$  des Verdünners (enthalten im ELISA-Kit) in jedes Well eingebracht. Jeweils 50  $\mu\text{l}$  einer Probe pro Well wurden aufgetragen, der Assay eine Minute gemischt, abgedeckt und schließlich für zwei Stunden inkubiert. Danach folgten fünf Waschdurchgänge mit jeweils 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer. Nun wurden 100  $\mu\text{l}$  Antikörper gegen das gesuchte Antigen aufgetragen, der Assay abgedeckt und für weitere zwei Stunden inkubiert. Danach schloß sich ein weiterer Waschvorgang an wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Substratlösung zu jedem Well hinzugefügt und für 30 Minuten lichtgeschützt entwickelt. Danach wurde die Stopplösung (enthalten im ELISA-Kit) hinzugefügt, um die Farbumwandlung zu stoppen. Die Auswertung erfolgte mittels eines Microplatereaders bei 450nm.

### 3.4 Tierversuche

Die für diese Arbeit erforderlichen Tierversuche wurden von Herrn Dr. med. Sebastian Braun und seiner Arbeitsgruppe (Klinik für Anästhesiologie; HHU Düsseldorf Direktor Univ. Prof. Dr. B. Pannen) vorgenommen. Für eine detailliertere Darstellung der Tierversuche sei auf die Dissertationsarbeit von Claudia Struck (Tierärztin, AG Dr. Braun, Klinik für Anästhesiologie, HHU Düsseldorf) verwiesen. Das Aktenzeichen des Tierversuchsantrags lautet 87-51.042010.A011 (Antragsteller Univ. Prof. Dr. B. Pannen, Genehmigungsdatum 06.04.2010).

Zusammenfassend wurden Wistar Ratten für die Versuche unter artgerechten Bedingungen und freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten.

Die Experimente wurden jeweils zur gleichen Tageszeit durchgeführt, um einen zirkadianen Einfluss zu minimieren. Analog wurde die Futterzufuhr präexperimentell jeweils unterbunden, bei fortbestehender Wasserversorgung.

Die Ratten wurden mit Pentobarbital (60mg/kg i.p.) narkotisiert, relaxiert (Pancuronium 1mg/kg i.v.) und endotracheal intubiert. Die Tiere erhielten während der Operation kristalloide Flüssigkeit (20ml/kg/h) und wurden gewärmt (37,0°C ± 0,5°C). Nach einer Stabilisierungsphase intraoperativ wurde die Portalvene und die Leberarterie des linkslateralen und mittleren Leberlappens abgeklemmt, um eine Ischämiephase von 60 Minuten zu induzieren und nachfolgend wieder entfernt, um eine Reperfusionphase zu ermöglichen. Die Gruppe IPC erhielt vor der o.g. Ischämiephase eine Präkonditionierung mittels 10 Minuten Ischämie und 10 Minuten Reperfusion. Die Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere erhielt 24 Stunden vor Ischämie und Reperfusion 8mg/kg KG Etanercept i.p. Die Gruppe der mit Anakinra präkonditionierten Tiere erhielt 24 Stunden vor Ischämie und Reperfusion und davor 100mg/kg KG Anakinra i.p. Die Gruppe der mit Taurin präkonditionierten Tiere erhielt sieben Tage vor Ischämie und Reperfusion Trinkwasser mit einer 3%igen Beigabe von Taurin.

Im Anschluss an die Operation wurde das Abdomen verschlossen und die Ratten nach Komplettierung der Reperfusionphase durch eine Überdosis Pentobarbital getötet.

Nach Ausbluten der Tiere erfolgte die arterielle Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung und die Entnahme der Leber, welche direkt in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Konfokale Laserscanningmikroskopie von Immunfluoreszenzpräparaten

In Vorarbeiten zeigte sich bereits, dass die hepatischen Transportproteine bei kalter Ischämie und Reperfusion der Leber einer lobulären Regulation unterliegen und dass sich diese Regulation von der Regulation bei obstruktiver Cholestase unterscheidet (Donner et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden deswegen hepatobiliäre Transportproteine nach warmer Ischämie und Reperfusion der Leber bezüglich einer lobulären Regulation immunhistologisch untersucht.

Für die Transporter Oatp1a4 und Oatp1b2 sei angemerkt, dass diese Transporter einer physiologischen Zonierung unterliegen (Meier und Stieger, 2002) und somit in der Zone 1 bereits in der Kontrollgruppe eine deutlich geringere Expression zeigen als in der Zone 3.

#### 4.1.1 Zonierte Regulation von hepatobiliären Transportproteinen nach warmer Ischämie und Reperfusion

In der quantitativen Auswertung der Immunfluoreszenzen nach warmer Ischämie und Reperfusion zeigte sich bei Bsep und Mrp2 eine deutliche Verminderung des Signals in den perizentralen Hepatozyten (Abb. 15 und 16). Die Signale der Kanalikuli wirkten unscharf im Vergleich zu Kontrolltieren. Bei dem nicht zonierten basolateralen Transporter Ntcp wirkte die Immunfluoreszenz in perizentralen Hepatozyten ebenfalls unscharf. Es kam jedoch zu keiner signifikanten Herabregulation des Immunfluoreszenzsignals nach I/R im Vergleich zu den Kontrollen. Es zeigte sich in der statistischen Auswertung der quantitativen Immunfluoreszenz jedoch eine signifikante Herabregulation des Signals bei Bsep und Mrp2 bei den perivenösen und periportalen Hepatozyten (siehe Abb. 3 und 5). Bei den zonierten basolateralen Transportproteinen wie Oatp1a4 und Oatp1b2 zeigte sich bei Letzterem, dass das Immunfluoreszenzsignal in perizentralen Hepatozyten nur noch in Zellen der unmittelbaren Umgebung um die Zentralvene erhalten bleibt (Abb. 13). Hier

zeigte sich nur eine signifikante Veränderung des perivenösen Signals bei Oatp1a4 in der quantitativen Immunfluoreszenz (Abb. 11).

In der quantitativen Immunfluoreszenz zeigte sich bei Bsep eine Reduktion des Signals in perivenösen Hepatozyten auf  $30,9 \pm 13,6\%$  ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle, Abb. 4) und in periportalen Hepatozyten auf  $62,6 \pm 23,7\%$  ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle, Abb. 4).

Bei Ntcp lag das Immunfluoreszenzsignal in perivenösen Hepatozyten bei  $80,4 \pm 8,9\%$  (nicht signifikant, Abb. 8) und in periportalen Hepatozyten bei  $97,3 \pm 14,7\%$  (nicht signifikant, Abb. 8).

Bei Mrp2 fand sich eine Reduktion des Immunfluoreszenzsignals in perivenösen Hepatozyten auf  $54,3 \pm 8,6\%$  ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle, Abb. 6) und in periportalen Hepatozyten auf  $92,2 \pm 6,4\%$  ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle, Abb. 6).

Bei Oatp1a1 und Oatp1b2 fand keine signifikante Regulation des Immunfluoreszenzsignals in perivenösen und periportalen Hepatozyten statt.

Bei Oatp1a4 fand sich eine Reduktion des Immunfluoreszenzsignals in perivenösen Hepatozyten auf  $79,3 \pm 18,9\%$  ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle, Abb. 12). In periportalen Hepatozyten wurde der Transporter nicht signifikant reguliert.

#### 4.1.2 Ergebnisse der Präkonditionierung mit Taurin

Die Auswertung der Immunfluoreszenzbilder der mit Taurin präkonditionierten Tiere zeigte eine teilweise Erholung des periportalen Signals bei Bsep im Vergleich zu den Tieren nach Ischämie und Reperfusion. Das Immunfluoreszenzsignal betrug  $42,2 \pm 7\%$  in perivenösen Hepatozyten (nicht signifikant) und  $87,6 \pm 2,5\%$  ( $p < 0,05$  vs. I/R, Abb. 4) in periportalen Hepatozyten. Es kommt somit nach Präkonditionierung zu einer statistisch signifikanten Verbesserung der zonalen Expression von Bsep in periportalen Hepatozyten.

Bei allen weiteren untersuchten Transportproteinen hatte eine Präkonditionierung mit Taurin keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die zonale Expression.

#### 4.1.3 Ergebnisse der ischämischen Präkonditionierung

Eine ischämische Präkonditionierung vor warmer Ischämie und Reperfusion führte zu einer weniger ausgeprägten Herabregulation von Mrp2 in periportalen Hepatozyten. Das Signal von Mrp2 in perivenösen Hepatozyten zeigte weniger subapikale Fluoreszenz als bei den Tieren nach Ischämie und Reperfusion in der Zone 1. Die quantitative Immunfluoreszenz von Mrp2 zeigte eine Verbesserung des Immunfluoreszenzsignals in perivenösen Hepatozyten durch IPC auf  $81,9 \pm 9,7\%$  ( $p < 0,05$  vs. I/R; Abb. 6).

In periportalen Hepatozyten wurde Mrp2 nicht signifikant verändert ( $92,8 \pm 9,7\%$ ).

Bei den übrigen untersuchten Transportern zeigte sich keine signifikante Regulation der Expression.

#### 4.1.4 Ergebnisse der Präkonditionierung mit Etanercept und Anakinra

In der Auswertung der mit Etanercept und Anakinra präkonditionierten Tiere zeigten sich bei der zonalen Expression der untersuchten Transporter keine Unterschiede zu den Tieren nach warmer Ischämie und Reperfusion.

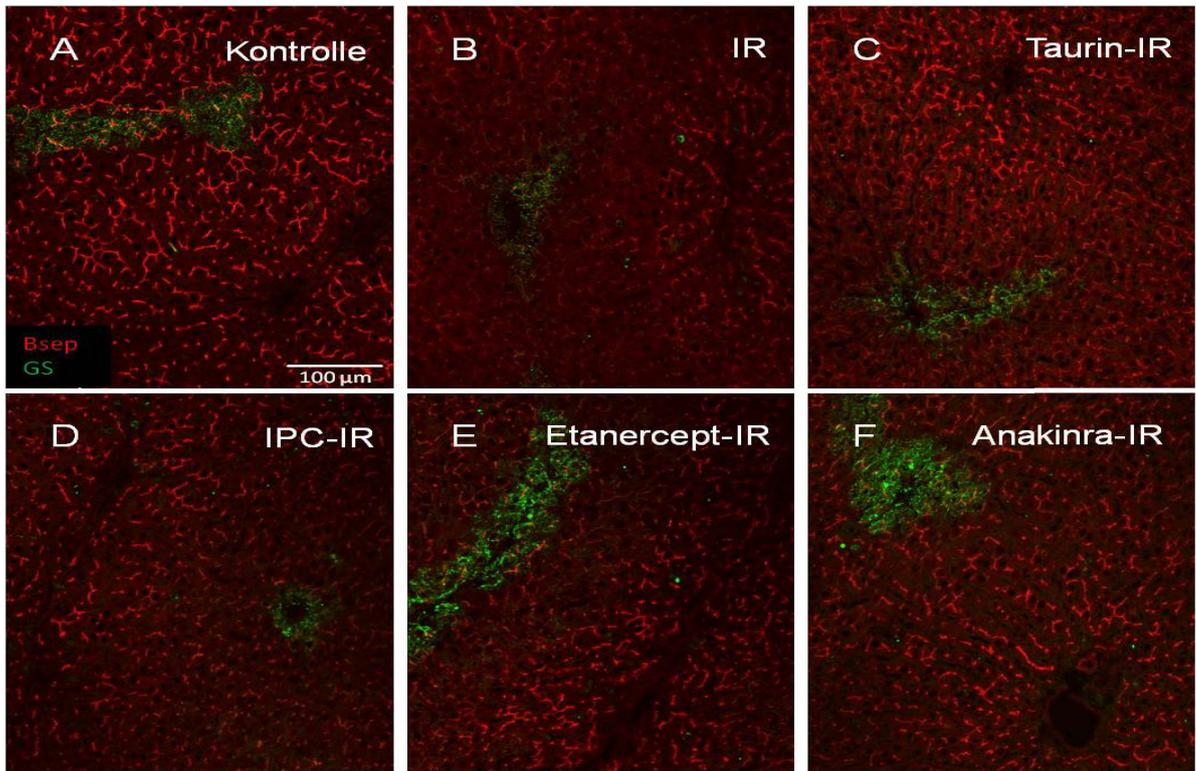


Abb. 3: Lokalisation von Bsep im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra. Kryoschnitte wurden mit dem polyklonalen Antikörper K44 gegen Bsep (rot) und mit einem monoklonalen AK gegen Glutaminsynthetase (grün) markiert. A, Kontrolle; B, IR; C, Taurin-IR; D, IPC-IR; E, Etanercept-IR; F, Anakinra-IR. IR, Ischämie und Reperfusion je 1h; IPC, ischämische Präkonditionierung 10 Min.

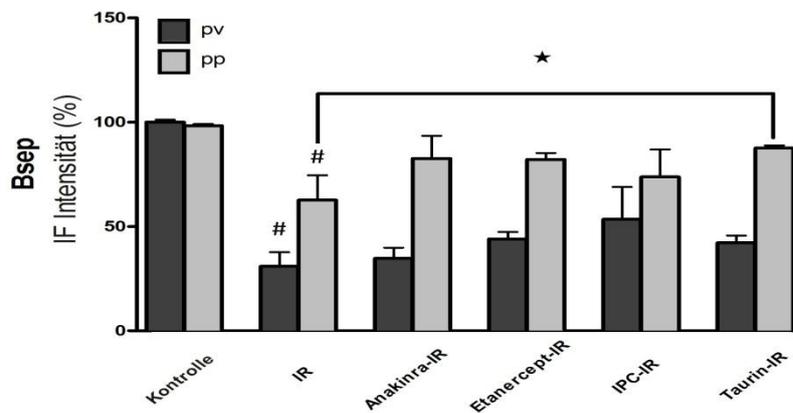


Abb. 4: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Bsep nach warmer Ischämie und Reperfusion der Leber. Für die densitometrische Auswertung wurde von n=4 Tieren/Gruppe die maximalen Signalintensitäten von jeweils 10 Membranen perivenöser und 10 periportal Hepatozyten pro Tier bestimmt. Die warme Ischämie und Reperfusion der Leber führte zu einer perivenös betonten Herabregulation von Bsep. Nach Präkonditionierung mit Taurin verbesserte sich die periportale Expression von Bsep (87,6% ± 2,6% vs. Kontrolle p < 0,05). pv, perivenös ; pp, periportal; \*p<0,05. #p<0,05 vs. Kontrolle.

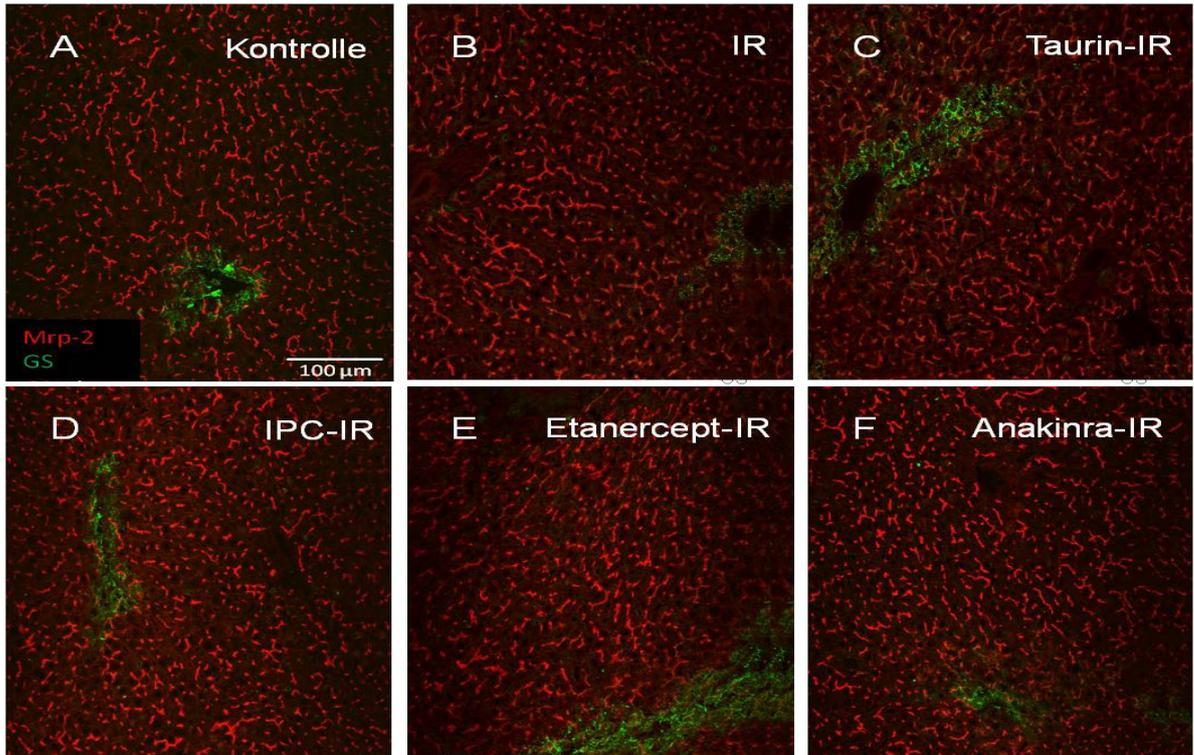


Abb. 5: Lokalisation von Mrp2 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra. Kryoschnitte wurden mit dem polyklonalen Antikörper EAG 15.4 gegen Mrp2 (rot) und mit einem monoklonalen AK gegen Glutaminsynthetase (grün) markiert. A, Kontrolle; B, IR; C, Taurin-IR; D, IPC-IR; E, Etanercept-IR; F, Anakinra-IR. IR, Ischämie und Reperfusion je 1h; IPC, ischämische Präkonditionierung 10 Min.

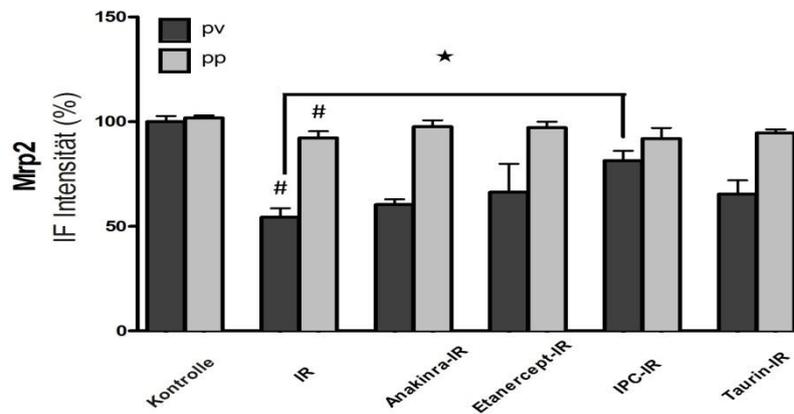


Abb.6: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Mrp2 nach warmer Ischämie und Reperfusion. Für die densitometrische Auswertung wurde von n=4 Tieren/Gruppe die maximalen Signalintensitäten von jeweils 10 Membranen perivenöser und 10 periportal Hepatozyten pro Tier bestimmt. Die warme Ischämie und Reperfusion der Leber führte zu einer perivenös betonten Herabregulation von Mrp2. Nach ischämischer Präkonditionierung verbesserte sich die perivenöse Expression von Mrp2 signifikant ( $81,9\% \pm 9,7\%$   $p < 0,05$  vs. Kontrolle). pv, perivenös ; pp, periportal; \* $p < 0,05$ . # $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

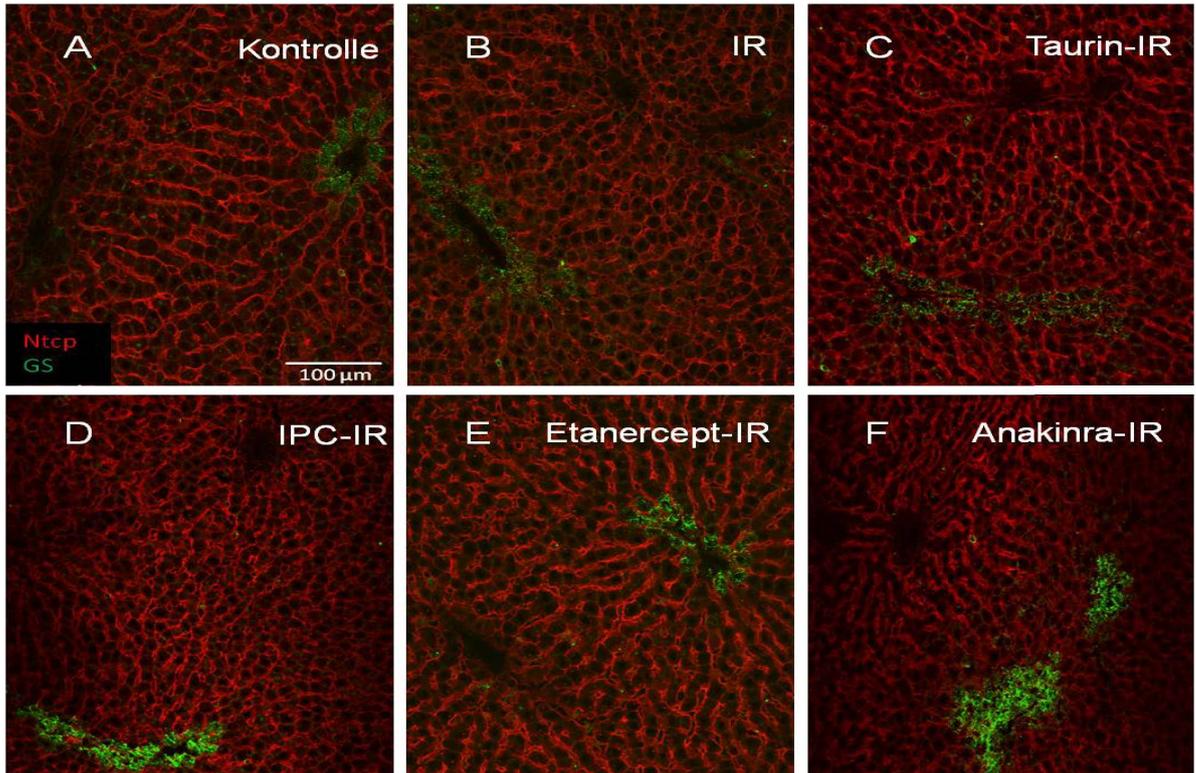


Abb. 7: Lokalisation von Ntcp im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra. Kryoschnitte wurden mit dem polyklonalen Antikörper K4 gegen Ntcp (rot) und mit einem monoklonalen AK gegen Glutaminsynthetase (grün) markiert. A, Kontrolle; B, IR; C, Taurin-IR; D, IPC-IR; E, Etanercept-IR; F, Anakinra-IR. IR, Ischämie und Reperfusion je 1h; IPC, ischämische Präkonditionierung 10 Min.

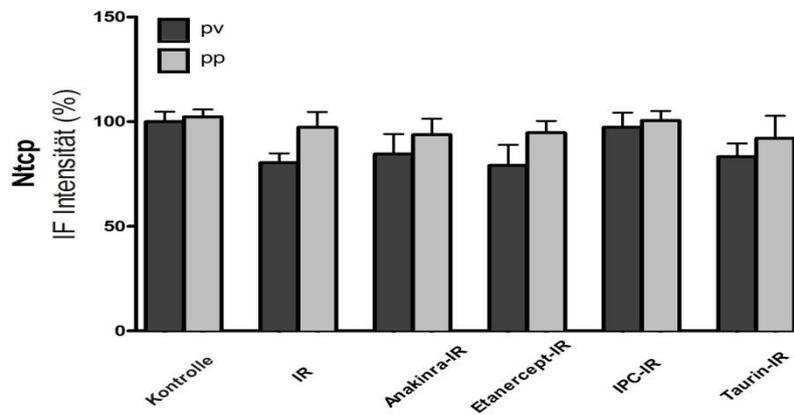


Abb.8: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Ntcp nach warmer Ischämie und Reperfusion. Für die densitometrische Auswertung wurde von n=4 Tieren/Gruppe die maximalen Signalintensitäten von jeweils 10 Membranen perivenöser und 10 periportal Hepatozyten pro Tier bestimmt. pv, perivenös ; pp, periportal.

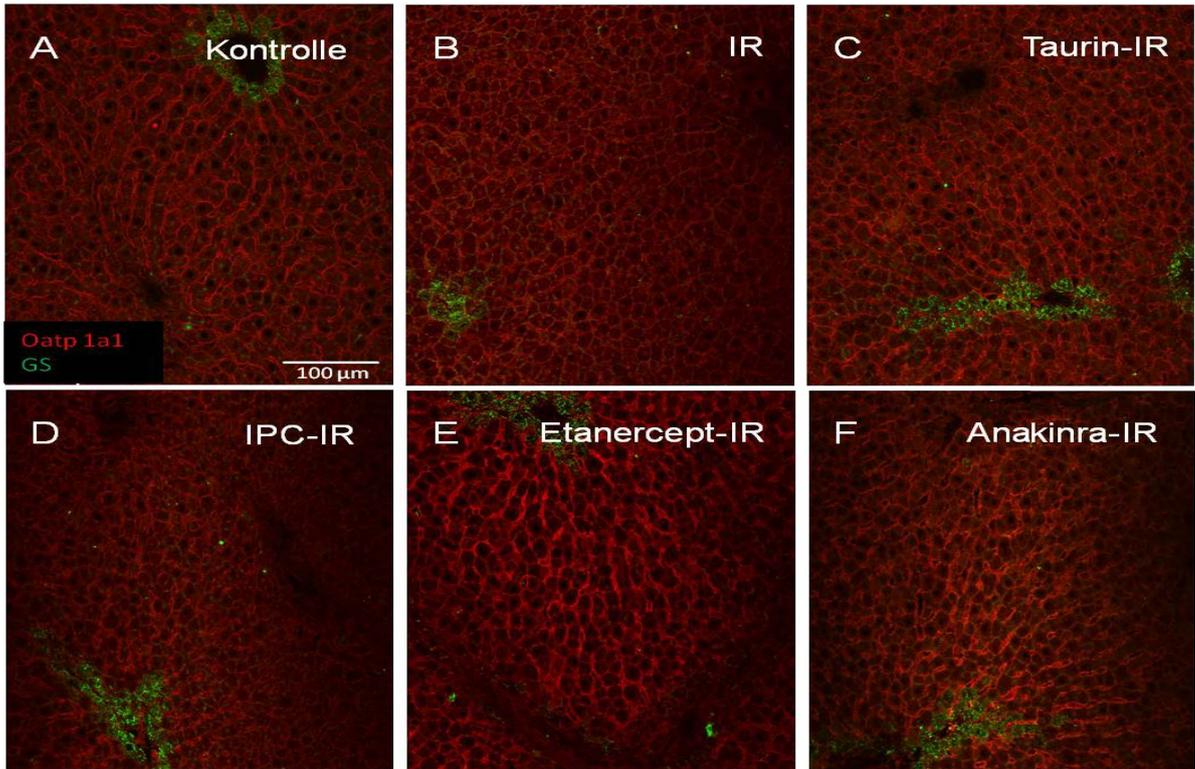


Abb.9: Lokalisation von Oatp1a1 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra. Kryoschnitte wurden mit dem polyklonalen Antikörper K10 gegen Oatp1a1 (rot) und mit einem monoklonalen AK gegen Glutaminsynthetase (grün) markiert. A, Kontrolle; B, IR; C, Taurin-IR; D, IPC-IR; E, Etanercept-IR; F, Anakinra-IR. IR, Ischämie und Reperfusion je 1h; IPC, ischämische Präkonditionierung 10 Min.

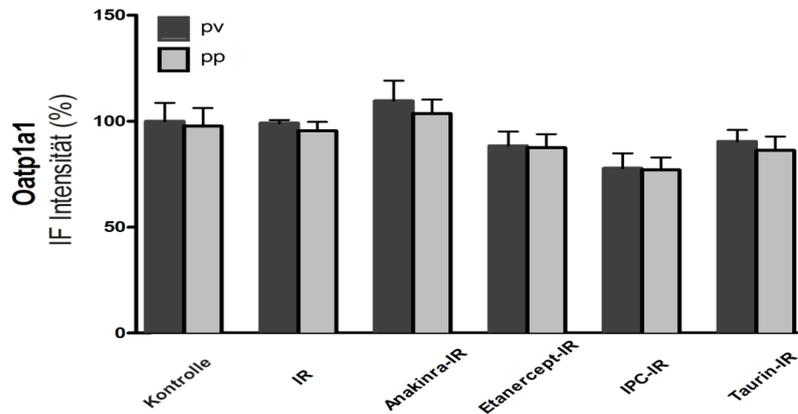


Abb.10: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Oatp1a1 (Oatp1) nach warmer Ischämie und Reperfusion. Für die densitometrische Auswertung wurde von n=4 Tieren/Gruppe die maximalen Signalintensitäten von jeweils 10 Membranen perivenös und 10 periportal Hepatozyten pro Tier bestimmt; pv, perivenös; pp, periportal.

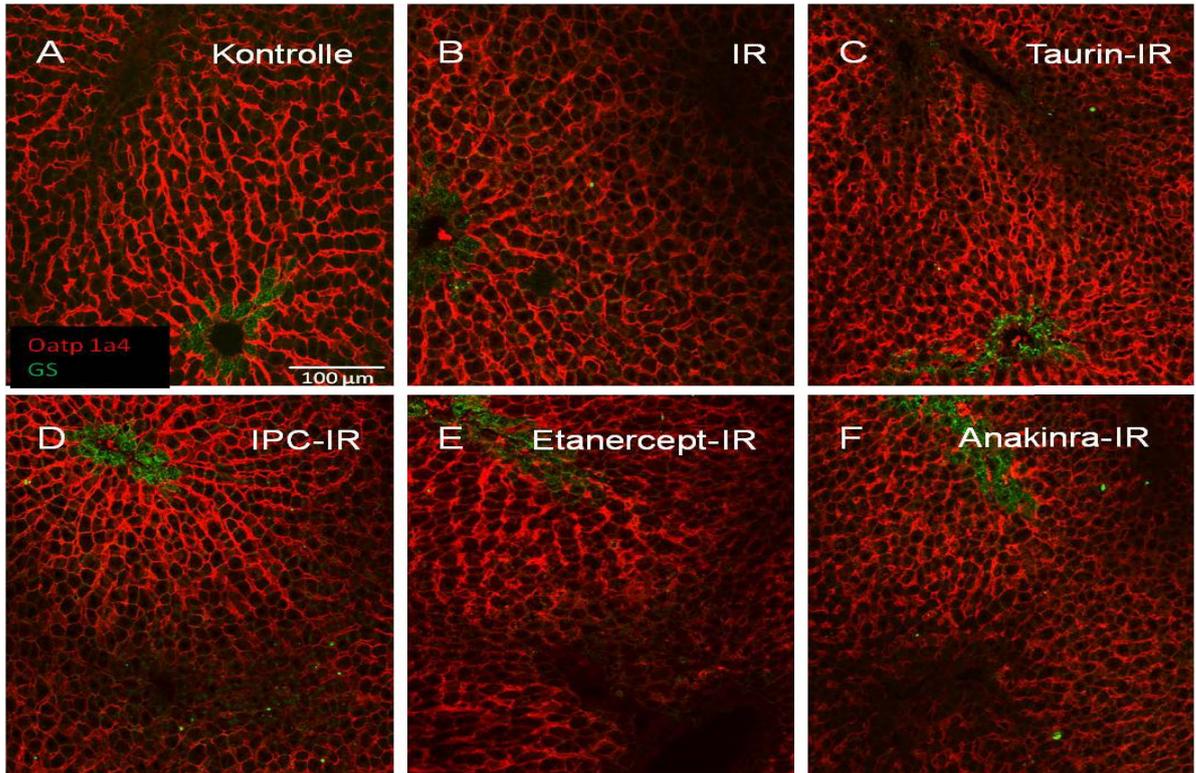


Abb.11: Lokalisation von Oatp1a4 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra. Kryoschnitte wurden mit dem polyklonalen Antikörper K15 gegen Oatp1a4 (rot) und mit einem monoklonalen AK gegen Glutaminsynthetase (grün) markiert. A, Kontrolle; B, IR; C, Taurin-IR; D, IPC-IR; E, Etanercept-IR; F, Anakinra-IR. IR, Ischämie und Reperfusion je 1h; IPC, ischämische Präkonditionierung 10 Min.

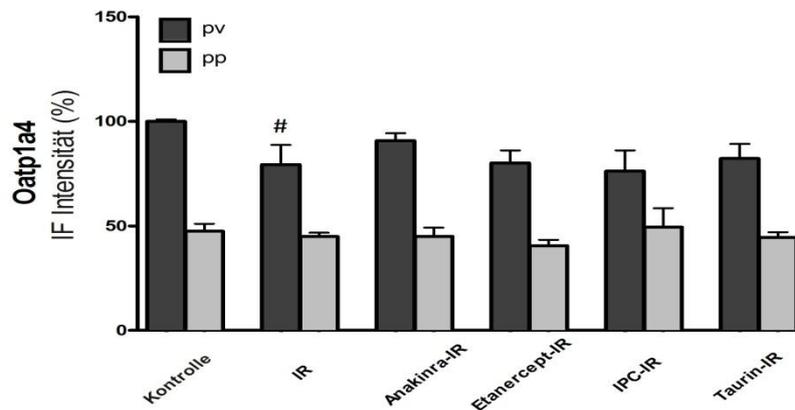


Abb.12: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Oatp1a4 (Oatp2) nach warmer Ischämie und Reperfusion. Für die densitometrische Auswertung wurde von n=4 Tieren/Gruppe die maximalen Signalintensitäten von jeweils 10 Membranen perivenöser und 10 periportal Hepatozyten pro Tier bestimmt; Die warme Ischämie und Reperfusion führte zu einer signifikanten Herabregulation von Oatp 1a4 in perivenösen Hepatozyten. pv, perivenös; pp, periportal. <sup>#</sup>p<0,05 vs. Kontrolle.

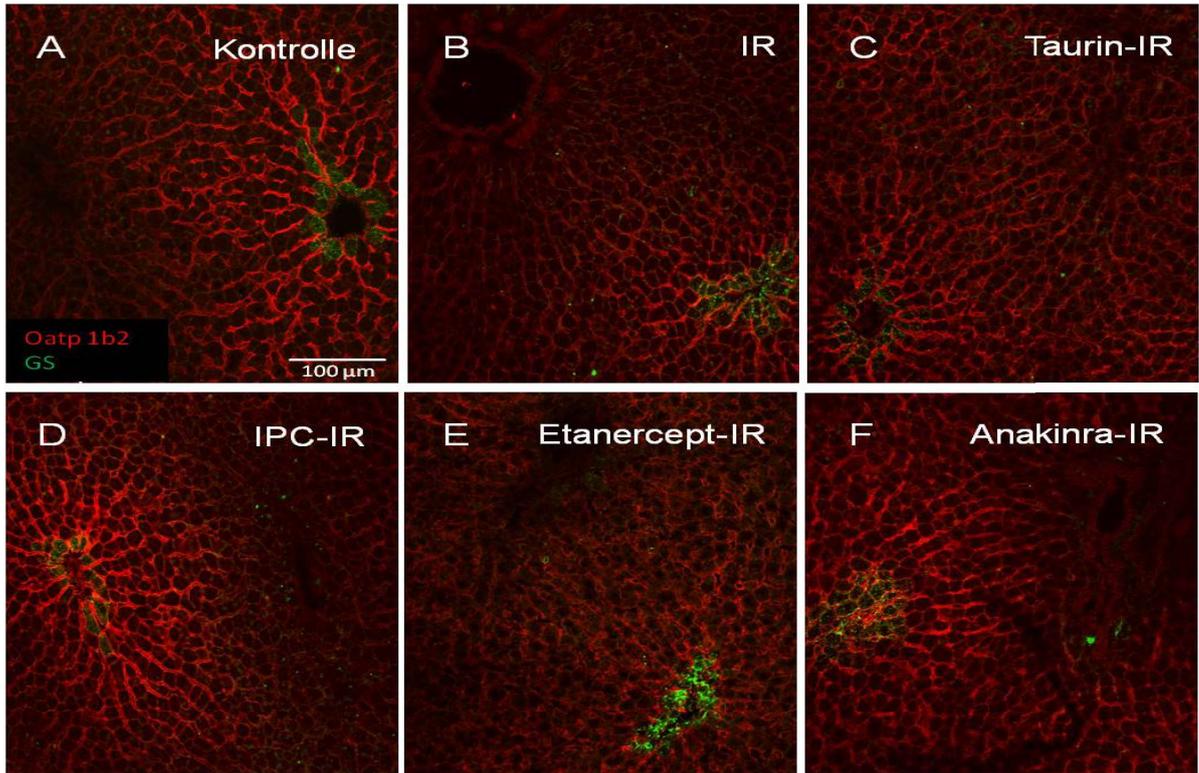


Abb 13: Lokalisation von Oatp1b2 im Rattenleberläppchen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie nach ischämischer Präkonditionierung, Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra. Kryoschnitte wurden mit dem polyklonalen Antikörper K22 gegen Oatp1b2 (rot) und mit einem monoklonalen AK gegen Glutaminsynthetase (grün) markiert. A, Kontrolle; B, IR; C, Taurin-IR; D, IPC-IR; E, Etanercept-IR; F, Anakinra-IR. IR, Ischämie und Reperfusion je 1h; IPC, ischämische Präkonditionierung 10 Min.

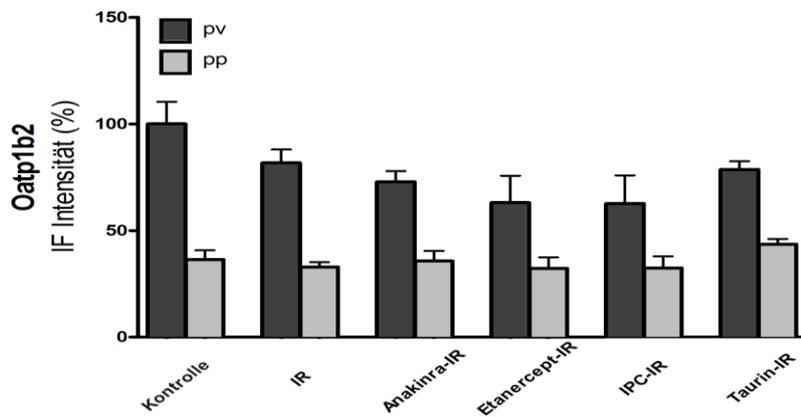


Abb.14: Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder von Oatp 1b2 (Oatp4) nach warmer Ischämie und Reperfusion. Für die densitometrische Auswertung wurde von n=4 Tieren/Gruppe die maximalen Signalintensitäten von jeweils 10 Membranen perivenöser und 10 periportal Hepatozyten bestimmt; pv, perivenös; pp, periportal.

## BSEP

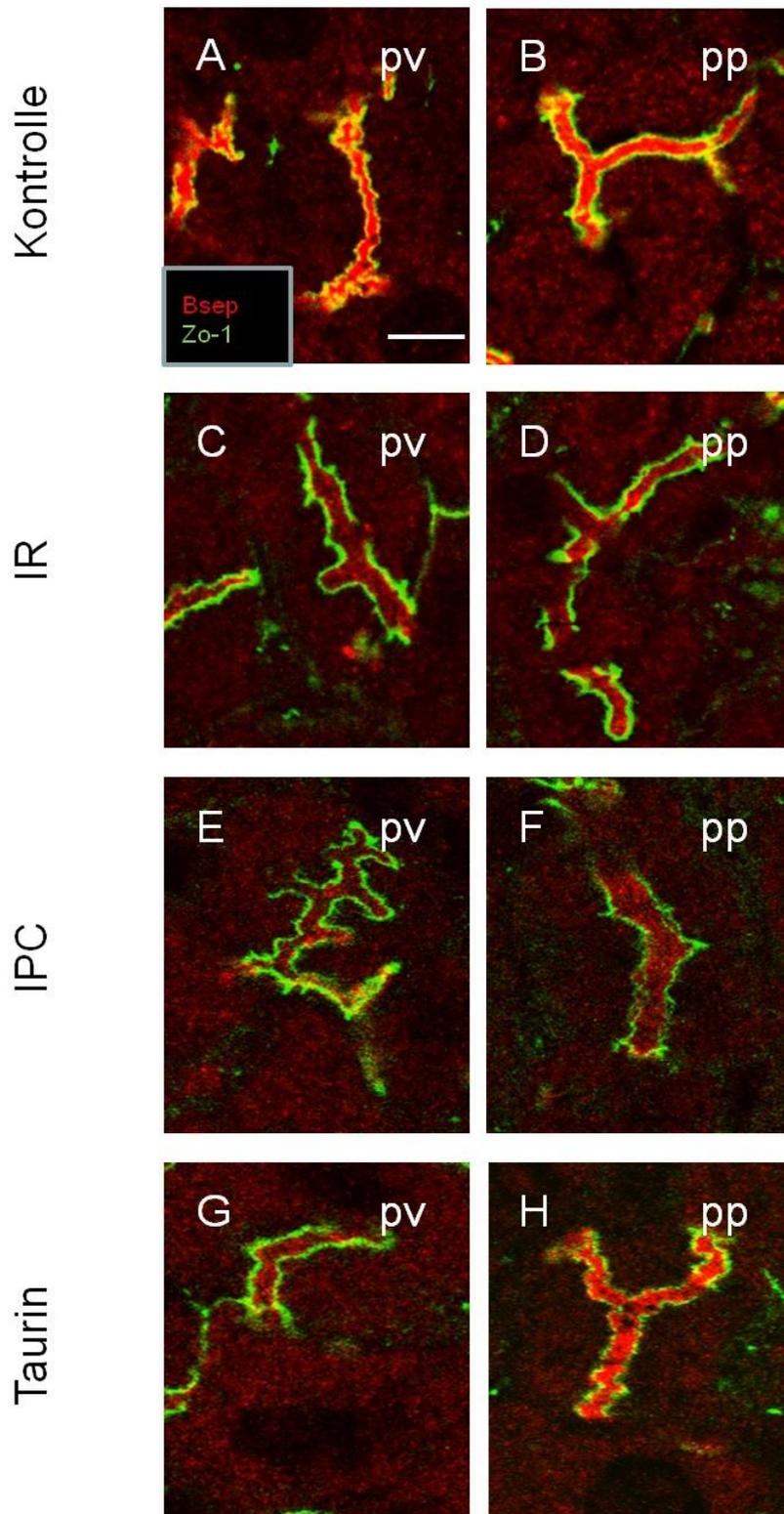


Abb. 15: Lokalisation von Bsep in perivenösen und periportalen Hepatozyten. Kryoschnitte von Rattenleber wurden gefärbt mit einem Antikörper gegen Bsep (rot) und gegen Zo-1 (grün) zur Darstellung der tight junctions. Balken in A entspricht 10  $\mu$ m. pp, periportal; pv, perivenös.

## MRP2

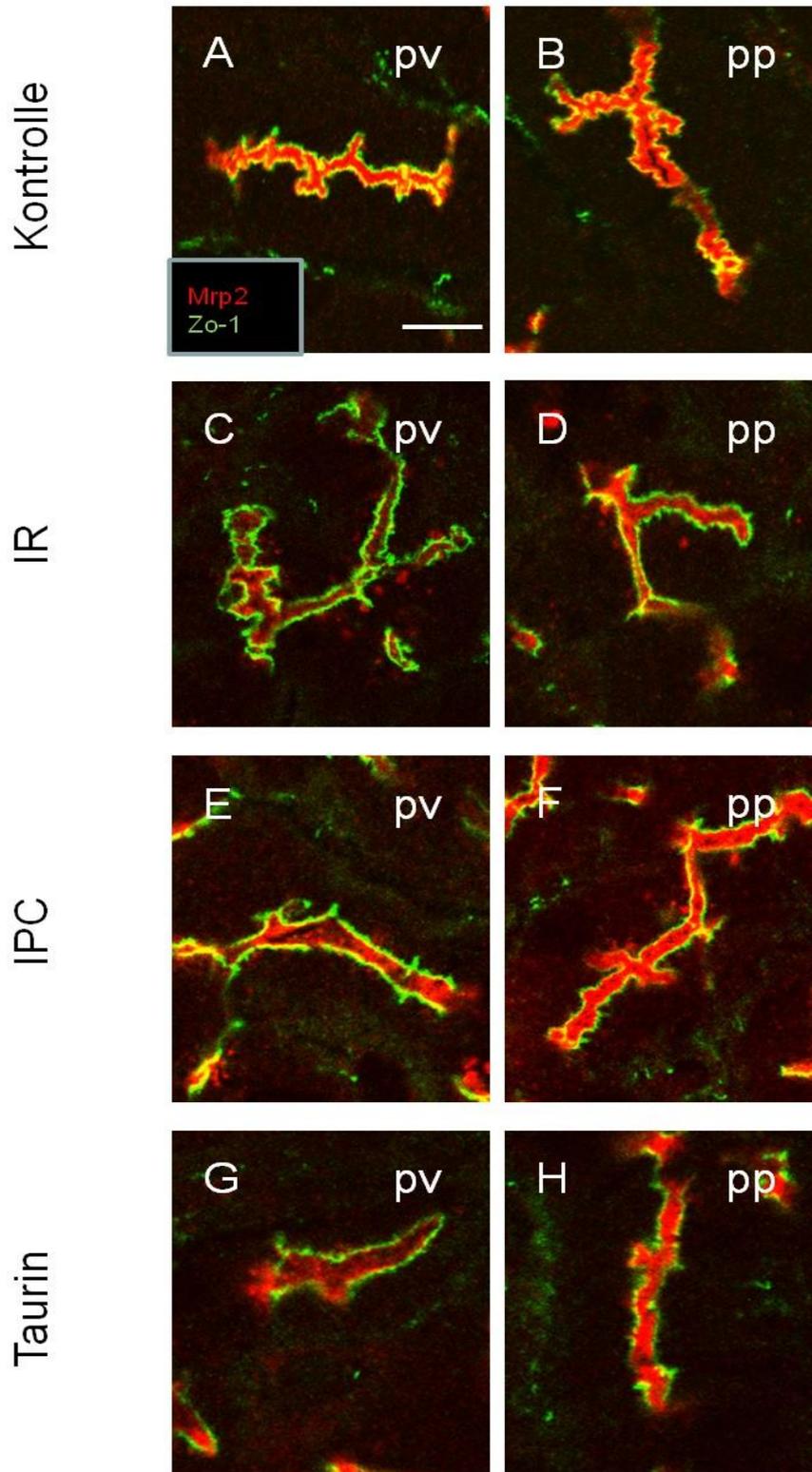


Abb. 16: Lokalisation von Mrp2 in perivenösen und periportalen Hepatozyten. Kryoschnitte von Rattenleber wurden gefärbt mit einem Antikörper gegen Mrp2 (rot) und gegen Zo-1 (grün) zur Darstellung der tight junctions. Balken in A entspricht 10  $\mu\text{m}$ . pp, periportal; pv, perivenös.

## 4.2 Proteinexpression von hepatischen Transportproteinen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie Effekt verschiedener Präkonditionierungsverfahren

Die Messung der Proteinexpression verschiedener hepatobiliärer Transporter wurde mittels Western Blot Analyse durchgeführt. Es wurden 50 µg Protein/Probe eingesetzt. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und nach Inkubation mittels Erst- und Zweitantikörper mittels Chemoluminiszenzverfahren auf Hyperfilm detektiert. Bsep wurde bei 160 kDa (Büchler et al., 1996), Mrp2 bei 190 kDa (Gerloff et al., 1998); Oatp1b2 bei 85 kDa, Oatp 1a4 und 1a1 bei 75 kDa und Ntcp bei 50 kDa detektiert.

### 4.2.1 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach warmer Ischämie und Reperfusion

Die Proteinexpression nach warmer Ischämie und Reperfusion zeigte bei den Transportproteinen Bsep, Mrp2, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 und Ntcp keine signifikante Regulation im Vergleich zu den Kontrollen.

### 4.2.2 Proteinexpression von hepatobiliären Transportern nach Präkonditionierungsverfahren

Nach der Präkonditionierung mit Taurin bei einer Versuchsreihe von n=4 Tieren war die Expression von Ntcp nach warmer Ischämie und Reperfusion auf 61% der Kontrolle reduziert ( $p < 0,05$  vs. I/R) (Abb. 19).

Die Proteinexpression der übrigen Transporter war nicht signifikant verändert.

Nach der Durchführung einer ischämischen Präkonditionierung bei einer Versuchsreihe von n=4 Tieren war die Expression von Ntcp nach warmer Ischämie und Reperfusion auf 73% der Kontrolle reduziert ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle, Abb. 19). Die Expression von Oatp 1a1 ging auf 82% der Kontrolle zurück ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle, Abb. 20). Die Expression der übrigen Transporter war nicht signifikant verändert.

Nach der Applikation von Etanercept und Anakinra kam es bei keinem der untersuchten Transporter zu einer veränderten Proteinexpression.

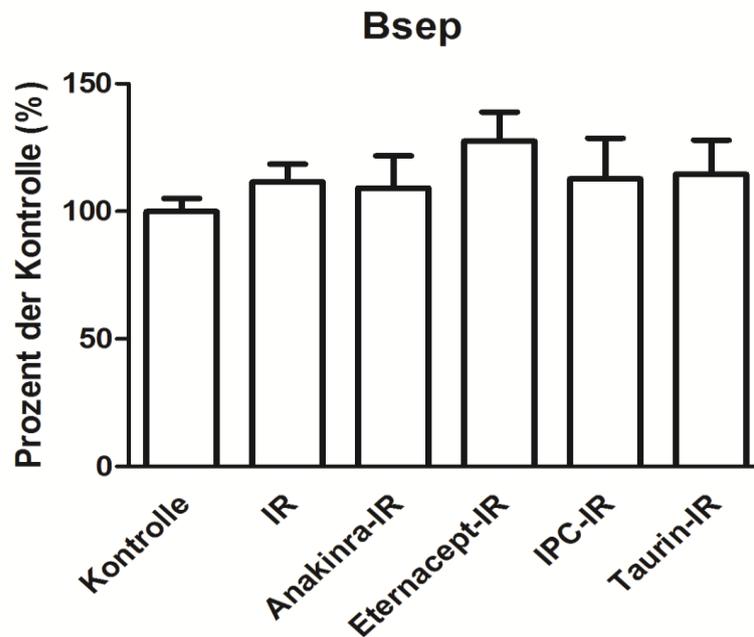
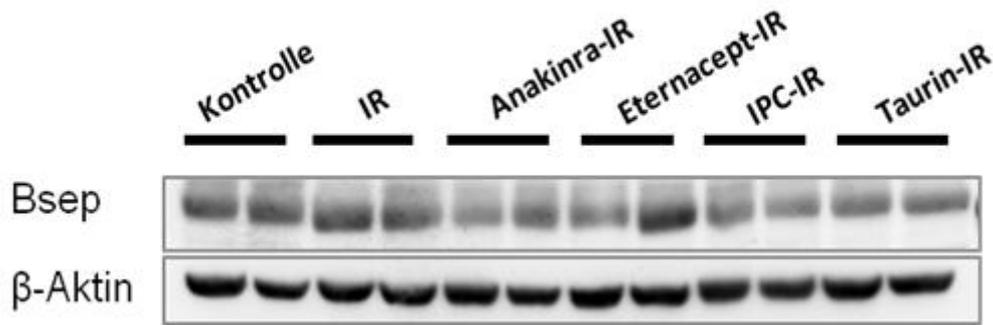


Abb.17: Immunoblotanalyse von Bsep nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etanercept und Anakinra.

Ratten wurden einer 60-minütigen warmen Ischämie und einer 60 minütigen Reperfusion der Leber unterzogen. Kontrolltiere erhielten eine Laparotomie ohne Leberischämie. Die ischämische Präkonditionierung (IPC) erfolgte durch 10-minütige Leberischämie gefolgt von 10 Minuten Reperfusion und 60 Minuten Erholung. Im Anschluss erfolgte die IR. Taurin wurde 7 Tage im Trinkwasser, Etanercept 24h vor IR und Anakinra 24 h vor IR ,sowie direkt vor IR i.p. verabreicht. Gesamtmembranen aus Lebergewebe wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert, sowie mit einem polyklonalen AK gegen das gesuchte Epitop inkubiert.

Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte aus n=4 Tieren pro Gruppe  $\pm$  SD dar.

Die Expression von Bsep unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant.

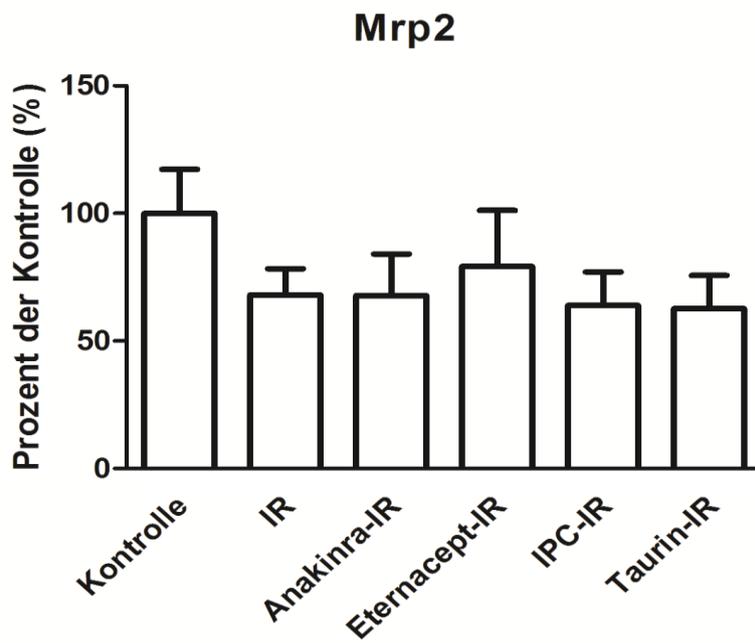
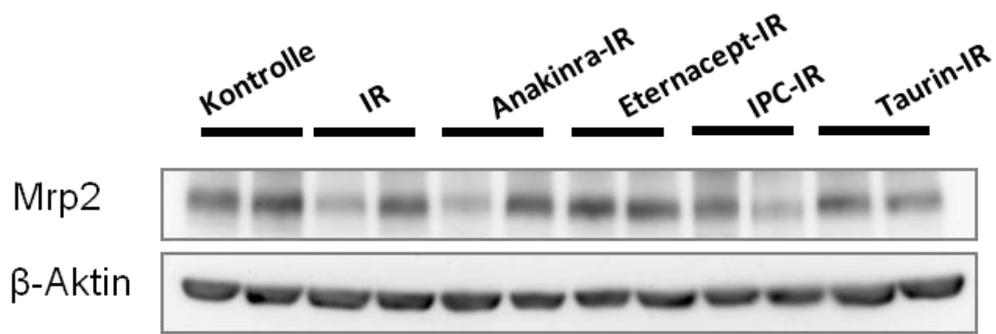


Abb.18: Immunoblotanalyse von Mrp2 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Etenarcept und Anakinra.

Methodik: siehe Abb. 17. Die Expression von Mrp2 unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant.

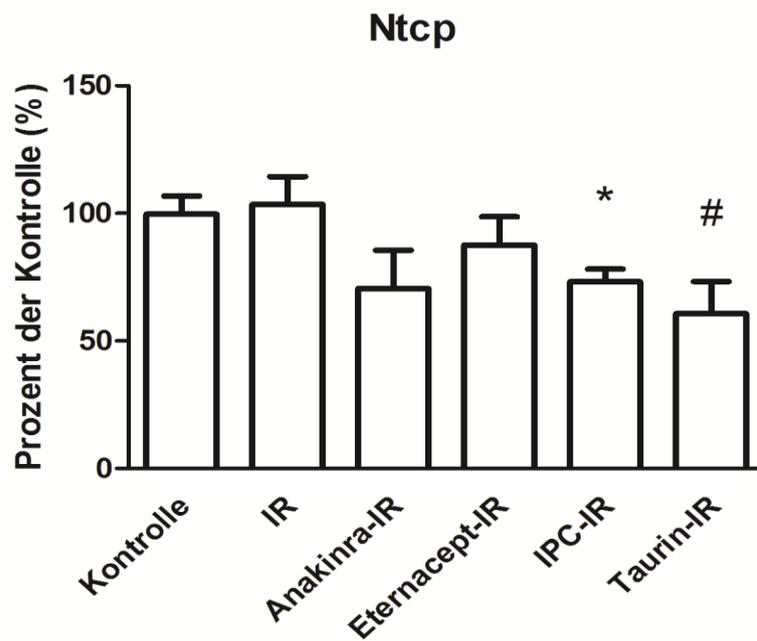
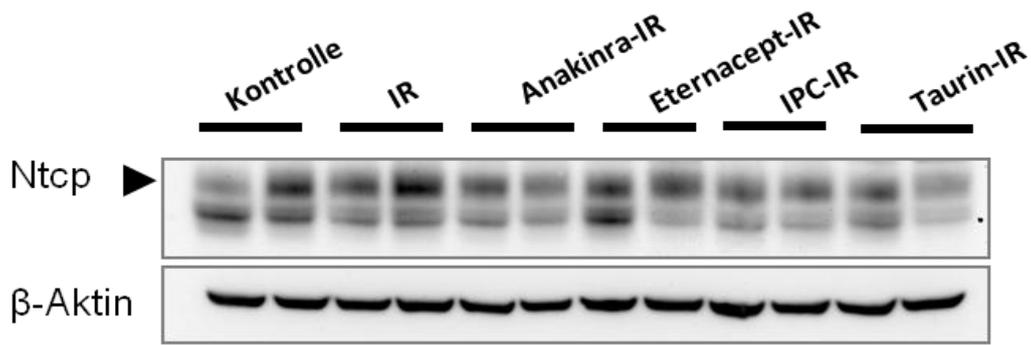


Abb.19: Immunoblotanalyse von Ntcp nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Anakinra, Etenacept, Taurin und ischämischer Präkonditionierung (IPC).

Methodik: siehe Abb. 17. Nach Tauringabe wurde Ntcp im Vergleich zur Ischämie- und Reperfusionsgruppe ohne Präkonditionierung signifikant herabreguliert (# $p < 0,05$ ) vs. IR. Nach IPC wurde Ntcp im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant herabreguliert (\*  $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle;  $n=4$ /Gruppe.

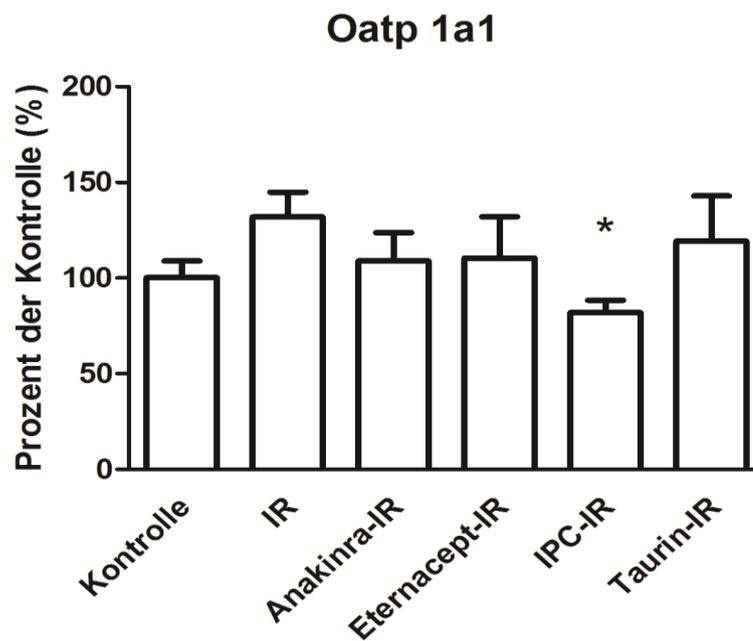
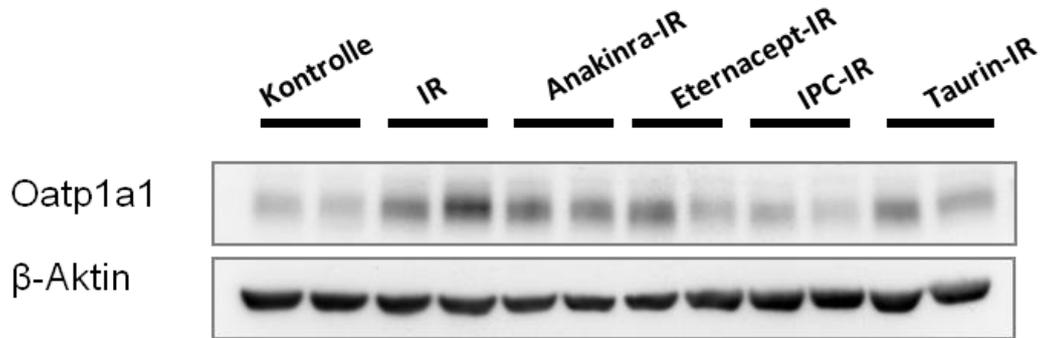


Abb.20: Immunoblotanalyse von Oatp1a1 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Eternacept und Anakinra.

Methodik: siehe Abb. 17. Nach ischämischer Präkonditionierung vor warmer Ischämie und Reperfusion zeigte sich eine signifikante Herabregulation von Oatp1a1 im Vergleich zur Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle; Mann-Whitney-Test;  $n = 4$ /Gruppe).

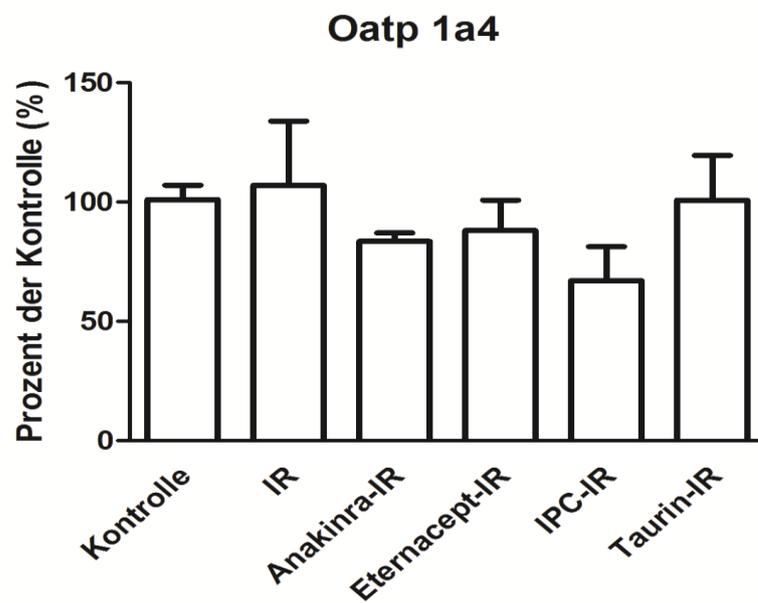
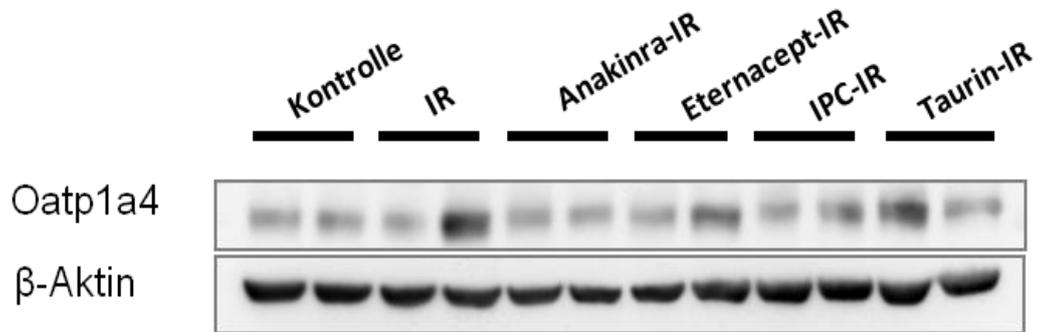


Abb.21: Immunoblotanalyse von Oatp1a4 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Eternacept und Anakinra.

Methodik: siehe Abb. 17. Die Expression von Oatp 1a4 unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant.

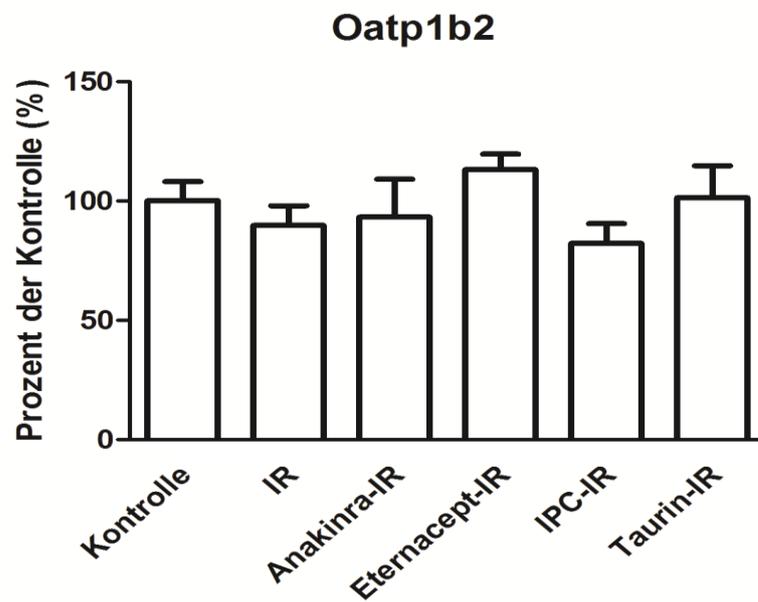
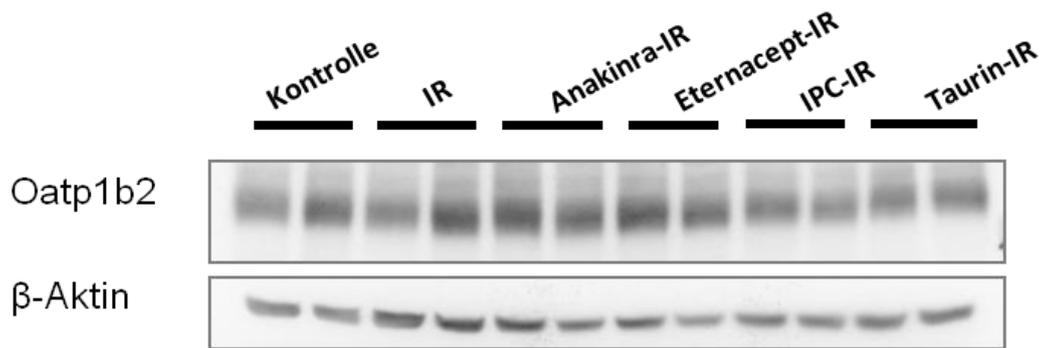


Abb.22: Immunoblotanalyse von Oatp1b2 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von Taurin, ischämischer Präkonditionierung (IPC), Anakinra und Etanercept.

Methodik: siehe Abb. 17. Die Expression von Oatp 1b2 unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant.

### 4.3 Zytokinkonzentrationen nach warmer Ischämie und Reperfusion, sowie Einfluss von verschiedenen Präkonditionierungsverfahren

Die Konzentration der drei proinflammatorische Zytokine IL1- $\beta$  , IL-6 und TNF- $\alpha$  wurde aus dem Überstand von Lebergewebslysaten mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zytokinkonzentration in pg/mg Protein angegeben (MW  $\pm$  SD, n=4/Gruppe).

#### 4.3.1 IL-6 und TNF- $\alpha$

Die Bestimmung der Konzentration der Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und TNF- $\alpha$  zeigte, dass sowohl die warme Ischämie und nachfolgende 60 minütige Reperfusion als auch verschiedene Präkonditionierungsverfahren zu keiner statistisch signifikanten Veränderung dieser Zytokine führten (Abb. 23 und 24).

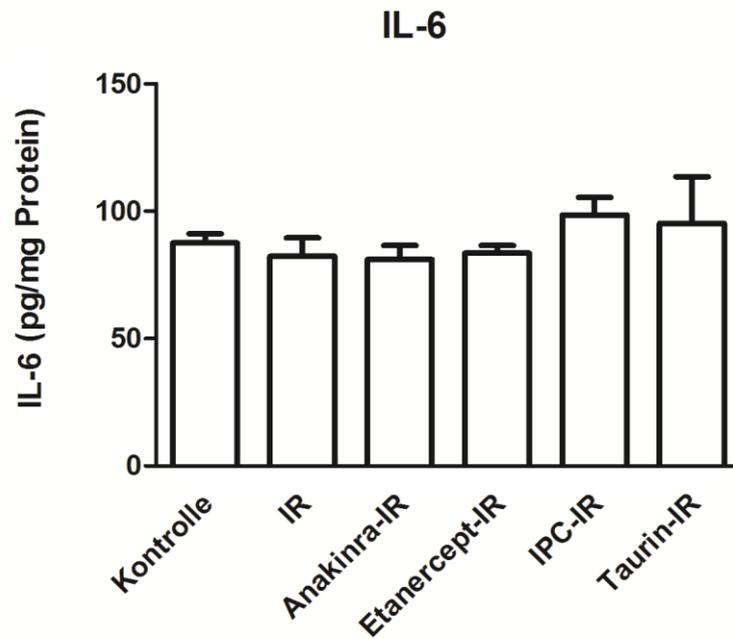


Abb. 23: Konzentration von IL-6 nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR), sowie der Effekt von ischämischer Präkonditionierung (IPC), Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra. Die Konzentration von IL-6 wurde aus dem Überstand von Lebergewebelysaten mittels ELISA gemessen. Die Expression von IL-6 in Lebergewebe von Ratten nach warmer Ischämie und Reperfusion wurde durch eine Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept, Anakinra oder IPC nicht verändert. Die Ergebnisse werden als Zytokinkonzentration in pg/mg Protein angegeben (MW  $\pm$  SD, n=4/Gruppe).

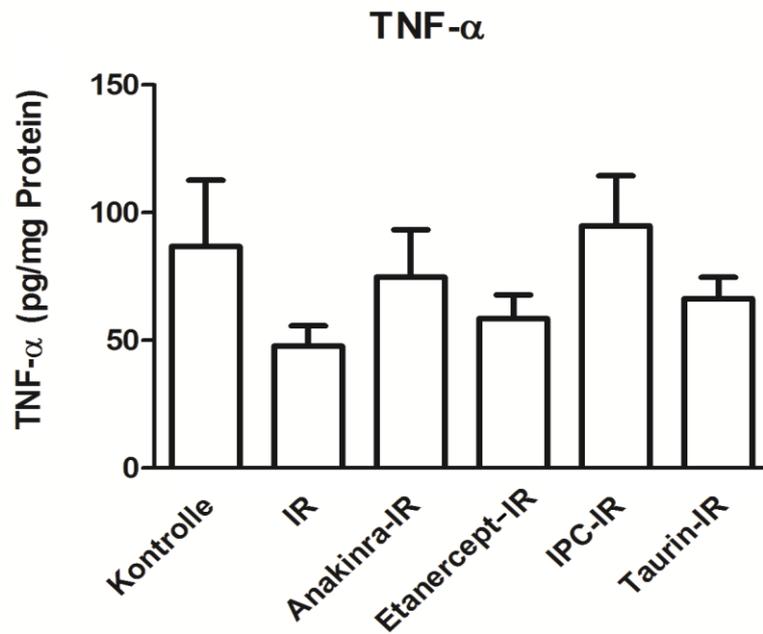


Abb.24: Konzentration von TNF- $\alpha$  nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR) ,sowie der Effekt von ischämischer Präkonditionierung (IPC), Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Zur Methodik: siehe Abb. 23. Die Konzentration von TNF- $\alpha$  in Lebergewebe von Ratten nach warmer Ischämie und Reperfusion wurde durch eine Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept, Anakinra oder IPC nicht verändert.

## 4.3.2

IL-1 $\beta$ 

Die Konzentration von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in der Leber war nach warmer Ischämie und Reperfusion auf  $50,75 \pm 10,4$  pg/mg Protein reduziert ( $p \leq 0,05$ ) (Abb.25).

Unter ischämischer Präkonditionierung (IPC-IR) und Präkonditionierung mit Taurin (Taurin-IR) betrug die Konzentration  $129,5 \pm 75$  pg/mg Protein für IPC-IR ( $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe,  $p < 0,05$  im Vergleich zur Gruppe IR) und  $61,25 \pm 22,8$  pg/mg Protein für Taurin-IR ( $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe). Die mit Etanercept präkonditionierten Tiere (Etanercept-IR) zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen. Die mit Anakinra präkonditionierten Tiere zeigten eine Konzentration von  $139 \pm 78,4$  pg/mg Protein ( $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe,  $p < 0,05$  im Vergleich zur Gruppe IR) (Abb. 25).

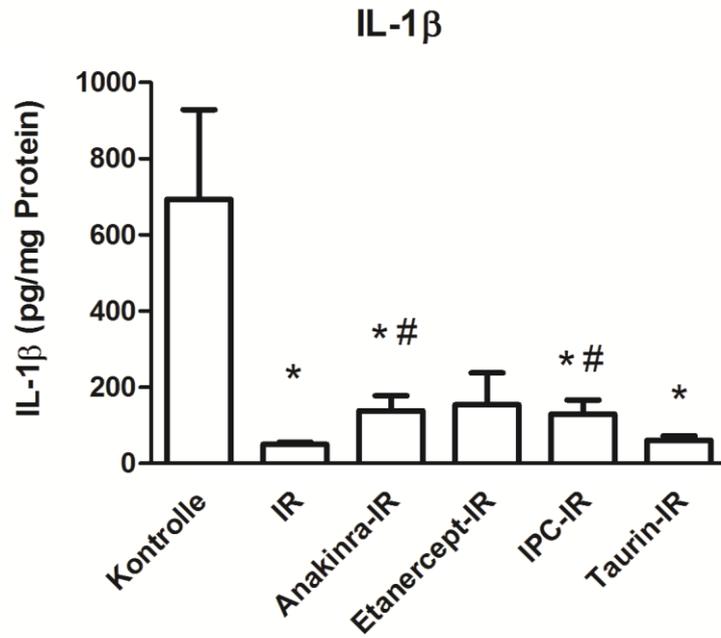


Abb.25: Konzentration von IL-1 $\beta$  nach warmer Ischämie und Reperfusion (IR) sowie der Effekt von ischämischer Präkonditionierung (IPC), Präkonditionierung mit Taurin, Etanercept und Anakinra.

Zur Methodik: siehe Abb. 23.

Die Expression von IL-1 $\beta$  war nach IR, Anakinra-IR, IPC-IR und Taurin-IR gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). Die Expression von IL-1 $\beta$  nach Anakinra-IR und IPC-IR war im Vergleich zu IR signifikant erhöht (\* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # =  $p < 0,05$  vs. IR; Mann-Whitney-Test;  $n=4$ /Gruppe).

## 5. Diskussion

### 5.1 Folgen einer Ischämie und Reperfusion der Leber für die hepatobiliäre Sekretion

Die warme Ischämie und Reperfusion ist ein häufiges Ereignis, sowohl bei operativen Eingriffen, bei denen eine passagere Unterbindung der Blutzufuhr zur Minimierung von intraoperativen Blutverlusten notwendig ist, als auch bei Kreislaufdysregulation, wie sie im Schock auftritt (Teoh und Farrell, 2003).

Ziel der Untersuchung war die Charakterisierung von molekularen Mechanismen, die nach Ischämie und Reperfusion zu dem bekannten klinischen Bild der Cholestase führen. Ferner sollten verschiedene therapeutische Ansätze untersucht werden, die die Expression hepatobiliärer Transporter beeinflussen.

In unseren Untersuchungen wählten wir eine Dauer von einer Stunde Ischämie gefolgt von einer Stunde Reperfusion, um die Expression und Lokalisation hepatobiliärer Transporter nach einer kurzen Phase von Ischämie und Reperfusion zu erfassen, da bei früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass die Kurzzeitregulation durch Endozytose ein wichtiger Regulationsmechanismus der hepatobiliären Sekretion ist (Häussinger et al., 2000).

Nach einer Phase von einer Stunde Ischämie und Reperfusion kam es in unserem Modell zu einer zonalen Regulation von hepatischen Transportproteinen.

Die apikalen Transportproteine Bsep und Mrp2 wurden in der Zone 3 des Leberläppchen herunterreguliert. Zusätzlich wurde Mrp2 in periportalen Hepatozyten zu einem geringeren Teil herabreguliert. Von untersuchten basolateralen hepatischen Transportproteinen wurde Oatp1a4 in perivenösen Hepatozyten herabreguliert. Die übrigen untersuchten Transporter werden im untersuchten Zeitraum nicht signifikant reguliert. Die Analyse verschiedener proinflammatorischer Zytokinkonzentrationen zeigte keinen Effekt der warmen Ischämie und Reperfusion auf TNF- $\alpha$  und IL-6. Die Konzentration von IL-1 $\beta$  wurde nach warmer Ischämie und Reperfusion vermindert.

Die Präkonditionierung mit Taurin führte zu einer verminderten Herabregulation von Bsep in der periportalen Zone 1 des Leberläppchens.

Eine ischämische Präkonditionierung (IPC) bewirkte eine verbesserte perivenöse Expression des apikalen Transportproteins Mrp2.

## 5.2 Mechanismen der zonalen Regulation von hepatischen Transportproteinen nach warmer Ischämie und Reperfusion

Die perizentral betonte Herabregulation der apikalen Transporter Bsep und Mrp2 nach warmer Ischämie und Reperfusion zeigte Regulationsmuster vergleichbar mit der Regulation bei kalter Ischämie und Reperfusion, sowie bei LPS-induzierter Cholestase (Donner et al., 2004; Donner et al., 2013). Es unterscheidet sich von dem Regulationsmuster bei obstruktiver Cholestase (Donner et al., 2007). Parallel hierzu kam es zu einer Herabregulation von Oatp1a4 in perizentralen Hepatozyten.

Die in unserer Untersuchung untersuchten basolateralen Transporter Ntcp, Oatp1a1 und Oatp1b2 zeigten keine signifikanten Veränderungen in der zonalen Expression.

Die beschriebene zonale Kurzzeitregulation, sowie eine verminderte Schärfe des Immunfluoreszenzsignals von Bsep und Mrp2 in den perizentralen Hepatozyten deuten auf eine posttranskriptionelle Regulation im Sinne einer Endozytose hin.

In der Immunoblotanalyse konnte keine Abnahme der Proteinexpression der Transporter Bsep und Mrp2, sowie Oatp1a4 gezeigt werden. In der durchgeführten Membranpräparation werden jedoch auch endozytierte Partikel erfasst, da in der in dieser Arbeit durchgeführten Membranpräparation das endosomale Kompartiment enthalten ist. Aus diesen Gründen war der mit der Immunfluoreszenz beschriebene Effekt nicht darstellbar. Ferner betraf der beschriebene Effekt zum überwiegenden Anteil perizentrale Leberzellen.

Eine endozytotische Herabregulation von apikalen Transportproteinen konnte bereits durch Behandlung mit LPS, durch Taurolithocholat, Estradiol 17- $\beta$ -D-

Glucuronid, sowie durch oxidativen Stress gezeigt werden (Vos et al., 1998; Dombrowski et al., 2000; Schmitt et al., 2000; Schmitt et al., 2001; Beuers et al., 2001; Crocenzi et al., 2003a+b; Crocenzi et al., 2004) .

Die beschriebene Regulation wird vermutlich durch Endozytose bewerkstelligt. Hinweise darauf sind die verminderte Schärfe des Immunfluoreszenzsignals und subapikale Vesikel.

Die molekularen Mechanismen der endozytotischen Regulation der apikalen Transportproteine bei Cholestase wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen untersucht (Crocenzi et al., 2012). Die Aktivierung der cPKC scheint eine Rolle bei der Vermittlung der Herabregulation von Bsep aus der kanalikulären Membran zu spielen (Pérez et al., 2006).

Die von uns beobachtete Regulation von Mrp2 und Bsep, welche ebenfalls bei kalter Ischämie und Reperfusion gezeigt werden konnte (Donner et al., 2013), könnte abhängig von einer Kupfferzellantwort sein und somit abhängig von proinflammatorischen Zytokinen, wie sie bereits in der Literatur postuliert ist für die kalte Ischämie und Reperfusion (Kudo et al., 2004).

Im Vergleich zu den apikalen Transportern gibt es über die Regulation von Oatp1a4 durch Zytokine keine Daten. Die Herabregulation von Oatp1a4 durch LPS (Donner et al., 2007) lässt jedoch vermuten, dass analog zu anderen hepatobiliären Transportern die LPS-induzierte Aktivierung von Kupfferzellen Mediatoren freisetzt, die diese Regulation triggern könnten. Mögliche Mediatoren könnten reaktive Sauerstoffspezies sein, da diese in der Rattenleber verschiedene Oatp-Isoformen unter oxidativem Stress herabregulieren (Tsujimoto et al., 2013).

Die Untersuchung basolateraler Transporter in einer früheren Arbeit ergab, dass es nach einer Phase von einer Stunde Ischämie und einer Phase von bis zu 48 Stunden Reperfusion zu einer Verminderung der RNA-Expression von Ntcp und der von uns untersuchten Oatp-Isoformen kommt (Tanaka et al 2006). In unserer Arbeit wurden die basolateralen Transportproteine außerhalb von Oatp1a4 nicht signifikant reguliert. In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass auf eine Phase von kalter Ischämie und Reperfusion eine zonale Herabregulation von Ntcp in perizentralen Hepatozyten folgt (44 Stunden Ischämie und 3 Stunden Reperfusion) (Donner et al., 2013). Es ist anzunehmen, dass die übrigen basolateralen Transportproteine zeitlich

nach den apikalen Transportproteinen reguliert werden, sodass eine kurze Reperfusionphase zu keiner signifikanten Regulation der meisten basolateralen Transporter führt. Die Herabregulation von basolateralen Transportern findet nach einer längeren Reperfusionphase statt. Dies konnte durch die Arbeitsgruppe von Tanaka gezeigt werden (Tanaka et al., 2006).

### 5.3 Fehlender Effekt einer pharmakologischen Hemmung von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$

Die Hemmung der Funktion von proinflammatorischen Zytokinen stellt eine Möglichkeit dar, einen Entzündungsprozess abzuschwächen und die schädigende Wirkung auf verschiedene betroffene Organen zu minimieren. Etanercept, ein Fusionsprotein, welches TNF- $\alpha$  bindet wird erfolgreich in der Therapie der rheumatoiden Arthritis beim Menschen eingesetzt, bei der sogenannte "*Disease modifying drugs*" (DMARDS) nicht ausreichend sind (Chen et al., 2006). Anakinra ist ein genetisch hergestellter Interleukin-1 $\beta$  Antagonist und wird ebenfalls in der Therapie von rheumatoider Arthritis und weiteren systemisch-inflammatorischen Erkrankungen benutzt (Mertens und Singh, 2009).

Nach einer Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer Aktivierung von Kupferzellen mit Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Coletti et al 1990; Teoh und Farrell, 2003; Kudo et al, 2004). Insbesondere werden TNF- $\alpha$  und IL1- $\beta$  in der Reperfusionphase ausgeschüttet (Coletti et al 1990; Teoh und Farrell, 2003).

In früheren Arbeiten konnte mittels Hemmung einer Zytokinantwort eine Verringerung eines Reperfusionsschadens in verschiedenen Organen gezeigt werden. So kam es nach Vorbehandlung von Ratten mit Etanercept zu einer Reduktion des Ischämie- und Reperfusionsschadens nach einer 24-stündigen Ischämie der Niere (Choi et al., 2009). Analog konnte in einer experimentellen Untersuchung eine Minderung des Ischämie- und Reperfusionsschadens am Hundeherz gezeigt werden. Dort wurde ebenfalls eine Hemmung von TNF- $\alpha$  mittels Gabe von Etanercept durchgeführt (Gu et al., 2006).

In der Leber konnte sowohl nach Aktivierung von Kupferzellen durch LPS, als auch durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  eine Cholestase erzeugt werden (Green et al.,

1996; Moseley, 1996; Donner et al., 2007). Es wurde somit spekuliert, dass die Herabregulation apikaler Transporter im vorliegenden Tiermodell auch durch diese proinflammatorischen Zytokine verursacht wird.

In unserem experimentellen Ansatz wurde bei warmer Ischämie und Reperfusion durch die Gabe von Etanercept zur Hemmung von TNF- $\alpha$  und durch die Gabe von Anakinra zur Hemmung von IL-1 $\beta$  untersucht, ob die beschriebene Regulation von apikalen Transportern und Oatp1a4 durch diese Zytokine vermittelt wird.

Die quantitativen Immunfluoreszenz zeigte keine signifikante Veränderung der Expression und Lokalisation von Bsep, Mrp2 und Oatp1a4.

Eine mögliche Ursache für den fehlenden Anstieg von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stellt der von uns gewählte Zeitraum von einer Stunde warmer Ischämie und Reperfusion dar, da in den ersten zwei Stunden der frühen Phase des Ischämie und Reperfusionsschadens vorwiegend oxidativer Stress eine Rolle spielt (Teoh und Farrell, 2003).

Über die Kurzzeitregulation von IL-1 $\beta$  nach warmer Ischämie und einer Stunde Reperfusion bei der Ratte gibt es bisher keine Daten. Untersuchungen nach 6-stündiger Perfusion nach einer Studie in der Maus zeigten einen Konzentrationsanstieg (Kim et al., 2015).

In ihrer Arbeit konnte die Arbeitsgruppe von Ilyas zeigen, dass der IL-1 $\beta$  abhängige Schaden in der Leber, wie er bspw. nach Exposition durch Hepatotoxine auftritt, durch Makrophagenautophagie gemindert werden kann, sodass anzunehmen ist, dass IL-1 $\beta$  eine Schlüsselrolle bei Leberschäden durch das angeborene Immunsystem hat (Ilyas et al., 2016).

In Vorarbeiten, die einen längeren Reperusionszeitraum wählten, kam es zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Durch Hemmung der Kupferzellantwort kam es zu niedrigeren TNF- $\alpha$ -Spiegeln und zu einer Verbesserung der Transporterexpression. Die durch Ischämie und Reperfusion verminderte mRNA-Expression von Oatp1a1, Oatp 1b2, Oatp1a4, Ntcp, Bsep und Mrp2 war weniger ausgeprägt (Tanaka et al., 2006).

Mögliche Vermittler in der frühen Reperusionsphase könnten somit reaktive Sauerstoffspezies sein wie z.B. das Superoxidanion, welches durch NADPH-Oxidase von inflammatorischen Zellen generiert wird (Teoh und Farrell, 2003).

Oxidativer Stress könnte so zu einer Internalisierung von für den Gallefluss notwendigen Transportern wie Bsep und Mrp2 führen.

Die Gabe des Prooxidans tert-Butylhydroperoxid (t-BOOH) bewirkte eine verminderte Gallensalzsekretion, einhergehend mit einer Internalisierung von Bsep (Pérez et al., 2006). Die Internalisierung von Mrp2 aus der kanalikulären Membran im Rahmen eines LPS-induzierten oxidativen Stress konnte durch die Gabe von "*dimerumic acid*" (DMA), einem Antioxidans aus der traditionellen chinesischen Medizin, vermindert werden (Sekine et al., 2010).

Antioxidantien könnten somit eine therapeutische Strategie zur Reduktion des cholestatischen Leberschadens nach Ischämie und Reperfusion der Leber darstellen.

#### 5.4 Therapeutischer Effekt von Taurin auf die Expression kanalikulärer Transporter nach warmer Ischämie und Reperfusion

Die bekannte Modulation der Kupferzellantwort durch die Aminosäure Taurin macht sie zu einer potentiellen pharmakologischen Substanz zur Reduktion des Leberschadens nach Ischämie und Reperfusion (Wettstein und Häussinger, 1997; Seabra et al., 1998).

Wir konnten zeigen, dass die periportale Herabregulation von Bsep signifikant weniger ausgeprägt war im Vergleich zur Ischämie- und Reperfusionsgruppe ohne Präkonditionierung. Die Messung der Proteinexpression von Bsep im Western Blot konnte die von uns in der Immunfluoreszenz gemessenen Veränderungen nicht abbilden, wie auch schon in Lebern nach warmer Ischämie und Reperfusion beschrieben (vgl. Abschnitt 5.1).

In der Proteinanalyse im Western Blot zeigte sich bei Ntcp eine Herabregulation. Dieser Effekt konnte in der Auswertung der Immunfluoreszenz nicht nachvollzogen werden, was ggf. technisch bedingt ist. Die zonale Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass Ntcp in perizentralen und periportalen Hepatozyten erhalten bleibt. Die IL-1 $\beta$  Konzentration war nach Präkonditionierung mit Taurin reduziert, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Gruppe nach warmer Ischämie und Reperfusion.

Die Präkonditionierung mit Taurin zeigte in unseren Untersuchungen keinen signifikanten Effekt auf die Verteilung der übrigen untersuchten hepatischen Transportproteine, sowie auf deren Proteinexpression.

In den Kupfferzellen kommt es nach Aktivierung zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1- $\beta$  und TNF- $\alpha$ , sowie zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Teoh und Farrell, 2003). Die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgt in der Frühphase des warmen Ischämie- und Reperfusionsschadens. Hauptquellen sind das Mitochondrium und Cytochrom P450 Enzyme der Mikrosomen (Teoh und Farrell, 2003).

An einem Kupfferzellmodell konnte der durch LPS induzierte Calciumeinstrom in die Kupfferzelle und die folgende TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Taurin vermindert werden durch Aktivierung eines glycinabhängigen Chloridkanals, der die Kupfferzelle hyperpolarisiert (Seabra et al., 1998).

Wettstein konnte zeigen, dass die Kupfferzellantwort nach warmer Ischämie und Reperfusion durch die Zugabe des Osmolyts Taurin in die Perfusionslösung den durch Ischämie und Reperfusion ausgelösten Leberschaden verringert (Wettstein und Häussinger, 1997). Dies konnte durch fallende LDH und AST-Konzentrationen (in Kombination mit Betain) im Effluat der Perfusionslösung gezeigt werden. (Mühlfeld et al. 2003) konnte zeigen, dass die orale Gabe von Taurin vor Applikation von LPS bei Ratten, was zu einer Herabregulation der apikalen Transporter Mrp2 und Bsep führte, die durch Lipopolysacharid (LPS) ausgelöste, experimentelle Cholestase abmildert.

Es wird somit spekuliert, dass Taurin seine therapeutische Wirkung auf Parameter der hepatobiliären Funktion nach warmer Ischämie und Reperfusion über eine Schwächung der Kupfferzellantwort ausübt. Vermutlich wirkt Taurin über eine verminderte Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies, da die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$  und IL-6) zu einem frühen Zeitpunkt der Reperusionsphase noch nicht erhöht ist.

## 5.5 Therapeutischer Effekt einer ischämischen Präkonditionierung auf die Expression hepatobiliärer Transporter nach warmer Ischämie und Reperfusion

Die ischämische Präkonditionierung ist eine schon seit Jahren bekannte Präkonditionierungsmethode zur Verminderung des Ischämie- und Reperfusionsschadens und wurde bereits in verschiedenen Organsystemen angewandt.

Murry et. al. haben die ischämische Präkonditionierung (IPC) 1986 als erste beschrieben. In einem Hundemodell konnte damals gezeigt werden, dass die ischämische Präkonditionierung die Infarktgröße am Herzen reduzieren kann (Murry et al., 1986).

In der Leber führte die IPC in einem Modell bei experimenteller warmer Ischämie und Reperfusion zu einem reduziertem Leberzellschaden. Dieser Effekt wird u.a. durch die stickstoffmonoxidabhängige Abschwächung der Effekte von Endothelin vermittelt, was schließlich zu einer Vasodilatation führt. (Peralta et al., 1996; Peralta et al., 1997; Peralta et al., 1998). Bei der Reoxygenierung der Xanthinoxidase in die Xanthindehydrogenase fallen reaktive Sauerstoffspezies an bei der Interaktion mit Sauerstoff. IPC senkt die Auswirkungen von oxidativem Stress, indem es die Akkumulation von Xanthin hemmt, welches das Substrat der Xanthinoxidase ist, sowie die Konversion der Xanthindehydrogenase in die Xanthinoxidase hemmt (Peralta et al., 1998; Fernández et al., 2002). Die verminderte Ausschüttung von ROS wiederum senkt die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  durch Kupfferzellen (Peralta et al., 2003).

Ischämische Präkonditionierung (IPC) aktiviert ferner p38MAPK und PKC, welche den I/R-assozierten Schaden reduzieren können, indem sie mit PKB/Akt interagieren (Carini et al., 2001; Carini und Albano, 2003).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine ischämische Präkonditionierung zur verringerten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 führt (Tsuyama et al., 2000). Somit ist anzunehmen, dass eine ischämische Präkonditionierung zu einer Modulation der Kupfferzellantwort nach Ischämie und Reperfusion durch Reduktion der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und proinflammatorischen Zytokinen führen kann (Peralta et al., 2003).

In unserer Analyse der zonalen Verteilung von hepatischen Transportproteinen konnten wir zeigen, dass IPC die perivenöse Herabregulation des apikalen Transportproteins Mrp2 signifikant abschwächt.

In der Analyse der Proteinexpression im Westernblot der Leberzelllysate zeigte sich eine durch IPC signifikant verminderte Expression des basolateralen Transportproteins Oatp1a1 und des basolateralen Transportproteins Ntcp im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es zeigte sich jedoch in den quantitativen Immunfluoreszenzuntersuchungen eine unveränderte Membranlokalisation dieser Transporter, sodass eine veränderte basolaterale Aufnahme von organischen Anionen und Gallensalzen durch IPC zum untersuchten Zeitpunkt unwahrscheinlich erscheint.

Durch die Anwendung der IPC als Präkonditionierungsmethode kann vermutlich eine verbesserte apikale Sekretion von Konjugaten erzielt werden, somit könnte die Technik zur Reduktion eines cholestatischen Leberschadens nach Ischämie und Reperfusion beitragen. In der Arbeit von Schonhoff et al. konnte gezeigt werden, dass eine Translokation von Mrp2 in die apikale Membran von Hepatozyten durch den p38 $\alpha$ MAPK-Weg gefördert wird (Schonhoff et al., 2010). Cholestase und Cholereze werden molekular über PKC-Isoformen vermittelt (Anwer, 2014).

Es ist anzunehmen, dass die perivenöse Herabregulation von Mrp2, sowie die Abschwächung der Herabregulation durch IPC über diese Signalwege vermittelt werden.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen von ausgeprägten Leberteilresektionen kann es zur Ausbildung einer Cholestase kommen. Durch Ischämie und Reperfusion ausgelöste Mechanismen werden als wichtiger ätiologischer Faktor für die Ausbildung einer Cholestase angesehen.

In dieser Arbeit wurden die Effekte von einer Stunde warmer Ischämie und einer Stunde Reperfusion der Leber auf die Lokalisation und Expression von hepatischen Transportproteinen (Bsep, Mrp2, Oatp1a1, Oatp1b2, Oatp1a4, Ntcp) und die Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, sowie verschiedene therapeutische Strategien zur Abschwächung einer Cholestase untersucht.

Die angewandten Präkonditionierungsmethoden umfassten die Vorbehandlung mit Taurin, die ischämische Präkonditionierung (IPC), sowie eine pharmakotherapeutische Hemmung der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  mittels Anakinra bzw. Etanercept.

Eine Stunde warme Ischämie und Reperfusion der Leber führte zu einer Herabregulation von Bsep, Mrp2 und Oatp1a4 in der perivenösen Zone 3 des Leberläppchen.

Durch die Präkonditionierung mit Taurin kam es zu einer Verbesserung der Expression von Bsep in periportalen Hepatozyten. Die Präkonditionierung mit IPC führte zu einer Verbesserung der Expression von Mrp2 in perizentralen Hepatozyten.

Es wird angenommen, dass beide Präkonditionierungsverfahren über die Reduktion von oxidativem Stress nach warmer Ischämie und Reperfusion die Herabregulation von hepatobiliären Transportern mindern. Die ischämische Präkonditionierung könnte zusätzlich über die Modulierung von intrazellulären Signalwegen wie dem p38-MAPK-Signalweg die Internalisierung von Mrp2 beeinflussen.

Mit der Präkonditionierung mit Taurin und IPC wurden zwei Strategien charakterisiert, die die Herabregulation kanalikulärer Transporter modulieren konnten und neue therapeutische Ansätze zur Verminderung des cholestatischen Leberschadens nach warmer Ischämie und Reperfusion aufzeigen.

## 7. Danksagung

Ich möchte folgenden Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger  
für die Aufnahme als Doktorand in die Forschungsgruppe, die Überlassung der Fragestellung und die hervorragende Infrastruktur der Forschungseinrichtung.

PD Dr. med. Markus Donner  
für die gute Betreuung dieser Arbeit vom Anfang bis zum Ende und die vielen guten, konstruktiven Gespräche.

Dr. rer. nat. Patricia Petridis (geb. Cebula)  
für die gute Zusammenarbeit und die fachliche Unterstützung bei der Einarbeitung im Labor und ihren Humor.

Meinen Eltern  
die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und mich unterstützt haben.

Und besonders meiner Ehefrau Alexandra  
die mir Kraft und Halt im Leben gibt.

8. Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 12.11.2016,

Thilo Kolb

Unterschrift

## 9. Literaturverzeichnis

Abu-Amara, M., Yang, S.Y., Tapuria, N., Fuller, B., Davidson, B., and Seifalian, A. (2010). Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl* *16*, 1016-1032.

Accatino, L. Pizarro, M., Solis, N., Arrese, M., Koenig, C. (2003). Bile secretory function after warm hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Liver Transplantation* Volume 9, Issue 11, 1199-1210.

Anwer, M.S. (2014). Role of protein kinase C isoforms in bile formation and cholestasis. *Hepatology* *60*, 1090-1097.

Atmaca, G. (2004). Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J* *45*, 776-788.

Baier, P.K., Hempel, S., Waldvogel, B., and Baumgartner, U. (2006). Zonation of hepatic bile salt transporters. *Dig Dis Sci* *51*, 587-593.

Ban, D., Kudo, A., Sui, S., Tanaka, S., Nakamura, N., Ito, K., Suematsu, M., and Arii, S. (2009). Decreased Mrp2-dependent bile flow in the post-warm ischemic rat liver. *J Surg Res* *153*, 310-316.

Benninghoff, Drenckhahn, *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 17 (14. April 2008)

Bernardi, P., Broekemeier, K.M., and Pfeiffer, D.R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* *26*, 509-517.

Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G.A., Keppler, D., Paumgartner, G., and Dombrowski, F. (2001). Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* *33*, 1206-1216.

Birdsall, T.C. (1998). Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev* *3*, 128-136.

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.

Byrne, J.A., Strautnieks, S.S., Mieli-Vergani, G., Higgins, C.F., Linton, K.J., and Thompson, R.J. (2002). The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* *123*, 1649-1658.

Büchler, M., König, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T., and Keppler, D. (1996). cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 271, 15091-15098.

Cao, J., Huang, L., Liu, Y., Hoffman, T., Stieger, B., Meier, P.J., and Vore, M. (2001). Differential regulation of hepatic bile salt and organic anion transporters in pregnant and postpartum rats and the role of prolactin. *Hepatology* 33, 140-147.

Cao, J., Stieger, B., Meier, P.J., and Vore, M. (2002). Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G757-766.

Carini, R., and Albano, E. (2003). Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 125, 1480-1491.

Carini, R., De Cesaris, M.G., Splendore, R., Vay, D., Domenicotti, C., Nitti, M.P., Paola, D., Pronzato, M.A., and Albano, E. (2001). Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 33, 131-139.

Cattori, V., Hagenbuch, B., Hagenbuch, N., Stieger, B., Ha, R., Winterhalter, K.E., and Meier, P.J. (2000). Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (rlst-1) in rat liver. *FEBS Lett* 474, 242-245.

Cattori, V., van Montfoort, J.E., Stieger, B., Landmann, L., Meijer, D.K., Winterhalter, K.H., Meier, P.J., and Hagenbuch, B. (2001). Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflugers Arch* 443, 188-195.

Chen, Y.F., Jobanputra, P., Barton, P., Jowett, S., Bryan, S., Clark, W., Fry-Smith, A., and Burls, A. (2006). A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness. *Health Technol Assess* 10, iii-iv, xi-xiii, 1-229.

Childs, S., Yeh, R.L., Georges, E., and Ling, V. (1995). Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res* 55, 2029-2034.

Childs, S., Yeh, R.L., Hui, D., and Ling, V. (1998). Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res* 58, 4160-4167.

Choi, D.E., Jeong, J.Y., Lim, B.J., Na, K.R., Shin, Y.T., and Lee, K.W. (2009). Pretreatment with the tumor necrosis factor-alpha blocker etanercept attenuated ischemia-reperfusion renal injury. *Transplant Proc* 41, 3590-3596.

Clavien, P.A., Selzner, M., Rüdiger, H.A., Graf, R., Kadry, Z., Rousson, V., and Jochum, W. (2003). A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 238, 843-850; discussion 851-842.

Crocenzi, F.A., Mottino, A.D., Cao, J., Veggi, L.M., Pozzi, E.J., Vore, M., Coleman, R., and Roma, M.G. (2003a). Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G449-459.

Crocenzi, F.A., Mottino, A.D., and Roma, M.G. (2004). Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis. Experimental therapeutic strategies for its prevention. *Curr Med Chem* 11, 501-524.

Crocenzi, F.A., Mottino, A.D., Sánchez Pozzi, E.J., Pellegrino, J.M., Rodríguez Garay, E.A., Milkiewicz, P., Vore, M., Coleman, R., and Roma, M.G. (2003b). Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in tauroolithocholate induced cholestasis in the rat. *Gut* 52, 1170-1177.

Crocenzi, F.A., Zucchetti, A.E., Boaglio, A.C., Barosso, I.R., Sanchez Pozzi, E.J., Mottino, A.D., and Roma, M.G. (2012). Localization status of hepatocellular transporters in cholestasis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17, 1201-1218.

Cui, Y., König, J., Buchholz, J.K., Spring, H., Leier, I., and Keppler, D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55, 929-937.

Currin, R.T., Gores, G.J., Thurman, R.G., and Lemasters, J.J. (1991). Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *FASEB J* 5, 207-210.

Currin, R.T., Peng, X.X., and Lemasters, J.J. (2012). Ischemic preconditioning of rat livers from non-heart-beating donors decreases parenchymal cell killing and increases graft survival after transplantation. *HPB Surg* 2012, 236406.

Denson, L.A., Auld, K.L., Schiek, D.S., McClure, M.H., Mangelsdorf, D.J., and Karpen, S.J. (2000a). Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *J Biol Chem* 275, 8835-8843.

Denson, L.A., Karpen, S.J., Bogue, C.W., and Jacobs, H.C. (2000b). Divergent homeobox gene hex regulates promoter of the Na(+)-dependent bile acid cotransporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G347-355.

Dombrowski, F., Kubitz, R., Chittattu, A., Wettstein, M., Saha, N., and Häussinger, D. (2000). Electron-microscopic demonstration of multidrug

resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J* 348 Pt 1, 183-188.

Donner, M.G., Schumacher, S., Warskulat, U., Heinemann, J., and Häussinger, D. (2007). Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G1134-1146.

Donner, M.G., Topp, S.A., Cebula, P., Krienen, A., Gehrman, T., Sommerfeld, A., Reinehr, R., Macher, A., Herebian, D., Mayatepek, E., *et al.* (2013). HbG200-mediated preinduction of heme oxygenase-1 improves bile flow and ameliorates pericentral downregulation of Bsep and Mrp2 following experimental liver ischemia and reperfusion. *Biol Chem* 394, 97-112.

Donner, M.G., Warskulat, U., Saha, N., and Häussinger, D. (2004). Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS. *Biol Chem* 385, 331-339.

Dranoff, J.A., McClure, M., Burgstahler, A.D., Denson, L.A., Crawford, A.R., Crawford, J.M., Karpen, S.J., and Nathanson, M.H. (1999). Short-term regulation of bile acid uptake by microfilament-dependent translocation of rat ntcp to the plasma membrane. *Hepatology* 30, 223-229.

Fellström, B., Aküyrek, L.M., Backman, U., Larsson, E., Melin, J., and Zezina, L. (1998). Postischemic reperfusion injury and allograft arteriosclerosis. *Transplant Proc* 30, 4278-4280.

Fernández, L., Heredia, N., Grande, L., Gómez, G., Rimola, A., Marco, A., Gelpí, E., Roselló-Catafau, J., and Peralta, C. (2002). Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 36, 562-572.

Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., and Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 257-263.

Fondevila, C., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2003). Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol* 74, 86-93.

Froger, N., Moutsimilli, L., Cadetti, L., Jammoul, F., Wang, Q.P., Fan, Y., Gaucher, D., Rosolen, S.G., Neveux, N., Cynober, L., *et al.* (2014). Taurine: the comeback of a nutraceutical in the prevention of retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res* 41, 44-63.

Fusai, G., Dhaliwal, P., Rolando, N., Sabin, C.A., Patch, D., Davidson, B.R., Burroughs, A.K., and Rolles, K. (2006). Incidence and risk factors for the development of prolonged and severe intrahepatic cholestasis after liver transplantation. *Liver Transpl* 12, 1626-1633.

- Gao, B., Stieger, B., Noé, B., Fritschy, J.M., and Meier, P.J. (1999). Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem* 47, 1255-1264.
- Gartung, C., Ananthanarayanan, M., Rahman, M.A., Schuele, S., Nundy, S., Soroka, C.J., Stolz, A., Suchy, F.J., and Boyer, J.L. (1996). Down-regulation of expression and function of the rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 110, 199-209.
- Gartung, C., Schuele, S., Schlosser, S.F., and Boyer, J.L. (1997). Expression of the rat liver Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporter is regulated in vivo by retention of biliary constituents but not their depletion. *Hepatology* 25, 284-290.
- Geier, A., Dietrich, C.G., Gerloff, T., Haendly, J., Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., Meier, P.J., Matern, S., and Gartung, C. (2003). Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1609, 87-94.
- Geier, A., Dietrich, C.G., Voigt, S., Ananthanarayanan, M., Lammert, F., Schmitz, A., Trauner, M., Wasmuth, H.E., Boraschi, D., Balasubramanian, N., *et al.* (2005). Cytokine-dependent regulation of hepatic organic anion transporter gene transactivators in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G831-841.
- Geier, A., Wagner, M., Dietrich, C.G., and Trauner, M. (2007). Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773, 283-308.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., and Meier, P.J. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273, 10046-10050.
- Gores, G.J., Nieminen, A.L., Wray, B.E., Herman, B., and Lemasters, J.J. (1989). Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *J Clin Invest* 83, 386-396.
- Green, R.M., Beier, D., and Gollan, J.L. (1996). Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. *Gastroenterology* 111, 193-198.
- Gu, Q., Yang, X.P., Bonde, P., DiPaula, A., Fox-Talbot, K., and Becker, L.C. (2006). Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 48, 320-328.

- Guan, L.Y., Fu, P.Y., Li, P.D., Li, Z.N., Liu, H.Y., Xin, M.G., and Li, W. (2014). Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J Gastrointest Surg* 6, 122-128.
- Gujral, J.S., Bucci, T.J., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2001). Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33, 397-405.
- Hagenbuch, B., and Dawson, P. (2004). The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 447, 566-570.
- Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93, 1326-1331.
- Hardikar, W., Ananthanarayanan, M., and Suchy, F.J. (1995). Differential ontogenic regulation of basolateral and canalicular bile acid transport proteins in rat liver. *J Biol Chem* 270, 20841-20846.
- Hashimoto, K., Uchiumi, T., Konno, T., Ebihara, T., Nakamura, T., Wada, M., Sakisaka, S., Maniwa, F., Amachi, T., Ueda, K., *et al.* (2002). Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 36, 1236-1245.
- Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21, 1393-1403.
- Howard, T.K., Klintmalm, G.B., Cofer, J.B., Husberg, B.S., Goldstein, R.M., and Gonwa, T.A. (1990). The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation* 49, 103-107.
- Huxtable, R.J. (1992) Physiological Actions of Taurine. *Physiological Reviews* , Vol. 72, No. 1, 1992
- Huxtable, R.J. (1996). Taurine. Past, present, and future. *Adv Exp Med Biol* 403, 641-650.
- Häussinger, D., Schmitt, M., Weiergräber, O., and Kubitz, R. (2000). Short-term regulation of canalicular transport. *Semin Liver Dis* 20, 307-321.
- Ilyas, G., Zhao, E., Liu, K., Lin, Y., Tesfa, L., Tanaka, K.E., and Czaja, M.J. (2016). Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 $\beta$ . *J Hepatol* 64, 118-127.
- Ismair, M.G., Stieger, B., Cattori, V., Hagenbuch, B., Fried, M., Meier, P.J., and Kullak-Ublick, G.A. (2001). Hepatic uptake of cholecystokinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver. *Gastroenterology* 121, 1185-1190.

Ito, T., Schaffer, S., and Azuma, J. (2014). The effect of taurine on chronic heart failure: actions of taurine against catecholamine and angiotensin II. *Amino Acids* 46, 111-119.

Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J. (1994). Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 133-137.

Jaeschke, H. (1998). Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5, 402-408.

Jaeschke, H., and Farhood, A. (1991). Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260, G355-362.

Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A.P., Spolarics, Z., and Spitzer, J.J. (1993). Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 264, G801-809.

Jungermann, K. (1988). Metabolic zonation of liver parenchyma. *Semin Liver Dis* 8, 329-341.

Jüngst, C., Berg, T., Cheng, J., Green, R.M., Jia, J., Mason, A.L., and Lammert, F. (2013). Intrahepatic cholestasis in common chronic liver diseases. *Eur J Clin Invest* 43, 1069-1083.

Kakyo, M., Sakagami, H., Nishio, T., Nakai, D., Nakagomi, R., Tokui, T., Naitoh, T., Matsuno, S., Abe, T., and Yawo, H. (1999a). Immunohistochemical distribution and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2). *FEBS Lett* 445, 343-346.

Kakyo, M., Unno, M., Tokui, T., Nakagomi, R., Nishio, T., Iwasashi, H., Nakai, D., Seki, M., Suzuki, M., Naitoh, T., *et al.* (1999b). Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rlst-1. *Gastroenterology* 117, 770-775.

Kartenbeck, J., Leuschner, U., Mayer, R., and Keppler, D. (1996). Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23, 1061-1066.

Kast, H.R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2002). 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.

Keppler, D., and König, J. (1997). Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J* 11, 509-516.

- Kim, H.J., Joe, Y., Yu, J.K., Chen, Y., Jeong, S.O., Mani, N., Cho, G.J., Pae, H.O., Ryter, S.W., and Chung, H.T. (2015). Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by modulating the miR-34a/SIRT1 pathway. *Biochim Biophys Acta* 1852, 1550-1559.
- Kincijs, M., Liang, R., Nickkholgh, A., Hoffmann, K., Flechtenmacher, C., Ryschich, E., Gutt, C.N., Gebhard, M.M., Schmidt, J., Büchler, M.W., *et al.* (2007). Taurine protects from liver injury after warm ischemia in rats: the role of kupffer cells. *Eur Surg Res* 39, 275-283.
- Kipp, H., and Arias, I.M. (2000). Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J Biol Chem* 275, 15917-15925.
- Kipp, H., Pichetshote, N., and Arias, I.M. (2001). Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem* 276, 7218-7224.
- König, J., Nies, A., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D., (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localisation, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 377-394.
- Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., and Häussinger, D. (2013). Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem* 31, 290-304.
- Kosters, A., and Karpen, S.J. (2008). Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica* 38, 1043-1071.
- Kudo, A., Kashiwagi, S., Kajimura, M., Yoshimura, Y., Uchida, K., Arii, S., and Suematsu, M. (2004). Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance 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., Ismail, M.G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P.J., and Hagenbuch, B. (2001). Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120, 525-533.
- Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20, 273-292.
- Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., and Meier, P.J. (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126, 322-342.

- Lecureur, V., Sun, D., Hargrove, P., Schuetz, E.G., Kim, R.B., Lan, L.B., and Schuetz, J.D. (2000). Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 57, 24-35.
- Lee, J.M., Trauner, M., Soroka, C.J., Stieger, B., Meier, P.J., and Boyer, J.L. (2000). Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 118, 163-172.
- Löffler, Petrides, Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Verlag; 2006
- Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*, 2. Auflage, Thieme Verlag; 2006
- Marra, F., and Tacke, F. (2014). Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology*.
- Meier, P.J. (1995). Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am J Physiol* 269, G801-812.
- Meier, P.J., Eckhardt, U., Schroeder, A., Hagenbuch, B., and Stieger, B. (1997). Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26, 1667-1677.
- Meier, P.J., and Stieger, B. (2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64, 635-661.
- Mertens, M., and Singh, J.A. (2009). Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 36, 1118-1125.
- Moore, Persaud, *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, 7th Edition, Saunders; 2003
- Moseley, R.H. (1996). Sepsis-associated jaundice. *Hepatology* 24, 969-970.
- Mukhopadhyay, S., Ananthanarayanan, M., Stieger, B., Meier, P.J., Suchy, F.J., and Anwer, M.S. (1997). cAMP increases liver Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am J Physiol* 273, G842-848.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
- Mühlfeld, A., Kubitz, R., Dransfeld, O., Häussinger, D., and Wettstein, M. (2003). Taurine supplementation induces multidrug resistance protein 2 and bile salt export pump expression in rats and prevents endotoxin-induced cholestasis. *Arch Biochem Biophys* 413, 32-40.

- Nakano, H., Kuzume, M., Namatame, K., Yamaguchi, M., and Kumada, K. (1995). Efficacy of intraportal injection of anti-ICAM-1 monoclonal antibody against liver cell injury following warm ischemia in the rat. *Am J Surg* 170, 64-66.
- Nies, A.T., and Keppler, D. (2007). The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453, 643-659.
- Noé, B., Hagenbuch, B., Stieger, B., and Meier, P.J. (1997). Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10346-10350.
- Noé, J., Stieger, B., and Meier, P.J. (2002). Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 123, 1659-1666.
- Pang, C.Y., Yang, R.Z., Zhong, A., Xu, N., Boyd, B., and Forrest, C.R. (1995). Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 29, 782-788.
- Pape, Hans-Christian; Klinke, Rainer; Silbernagl, Stefan: *Physiologie*, 5. Auflage, Thieme Verlag, 2005
- Peralta, C., Closa, D., Hotter, G., Gelpí, E., Prats, N., and Roselló-Catafau, J. (1996). Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 229, 264-270.
- Peralta, C., Closa, D., Xaus, C., Gelpí, E., Roselló-Catafau, J., and Hotter, G. (1998). Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 28, 768-773.
- Peralta, C., Hotter, G., Closa, D., Gelpí, E., Bulbena, O., and Roselló-Catafau, J. (1997). Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 25, 934-937.
- Peralta, C., Serafin, A., Fernández-Zabalegui, L., Wu, Z.Y., and Roselló-Catafau, J. (2003). Liver ischemic preconditioning: a new strategy for the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 35, 1800-1802.
- Pérez, L.M., Milkiewicz, P., Elias, E., Coleman, R., Sánchez Pozzi, E.J., and Roma, M.G. (2006). Oxidative stress induces internalization of the bile salt export pump, Bsep, and bile salt secretory failure in isolated rat hepatocyte couplets: a role for protein kinase C and prevention by protein kinase A. *Toxicol Sci* 91, 150-158.
- Redmond, H.P., Stapleton, P.P., Neary, P., and Bouchier-Hayes, D. (1998). Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition* 14, 599-604.

Reichel, C., Gao, B., Van Montfoort, J., Cattori, V., Rahner, C., Hagenbuch, B., Stieger, B., Kamisako, T., and Meier, P.J. (1999). Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* 117, 688-695.

Roth, S., Li, B., Rosenbaum, P.S., Gupta, H., Goldstein, I.M., Maxwell, K.M., and Gidday, J.M. (1998). Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 777-785.

Rüdiger, H.A., and Clavien, P.A. (2002). Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 122, 202-210.

Sastre, J., Pallardó, F.V., and Viña, J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* 35, 1-8.

Schemmer, P., Liang, R., Kincius, M., Flechtenmacher, C., Bunzendahl, H., Gutt, C.N., Mehrabi, A., Gebhard, M.M., Büchler, M.W., and Kraus, T.W. (2005). Taurine improves graft survival after experimental liver transplantation. *Liver Transpl* 11, 950-959.

Schmitt, M., Kubitz, R., Lizun, S., Wettstein, M., and Häussinger, D. (2001). Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 33, 509-518.

Schmitt, M., Kubitz, R., Wettstein, M., vom Dahl, S., and Häussinger, D. (2000). Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol Chem* 381, 487-495.

Schonhoff, C.M., Webster, C.R., and Anwer, M.S. (2010). Cyclic AMP stimulates Mrp2 translocation by activating p38 $\alpha$  MAPK in hepatic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G667-674.

Seabra, V., Stachlewitz, R.F., and Thurman, R.G. (1998). Taurine blunts LPS-induced increases in intracellular calcium and TNF-alpha production by Kupffer cells. *J Leukoc Biol* 64, 615-621.

Sekine, S., Yano, K., Saeki, J., Hashimoto, N., Fuwa, T., and 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.

Shih, D.Q., Bussen, M., Sehayek, E., Ananthanarayanan, M., Shneider, B.L., Suchy, F.J., Shefer, S., Bollileni, J.S., Gonzalez, F.J., Breslow, J.L., *et al.* (2001). Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* 27, 375-382.

Simon, F.R., Fortune, J., Iwahashi, M., Bowman, S., Wolkoff, A., and Sutherland, E. (1999). Characterization of the mechanisms involved in the

gender differences in hepatic taurocholate uptake. *Am J Physiol* 276, G556-565.

Simon, F.R., Fortune, J., Iwahashi, M., Qadri, I., and Sutherland, E. (2004). Multihormonal regulation of hepatic sinusoidal Ntcp gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G782-794.

Siriussawakul, A., Zaky, A., and Lang, J.D. (2010). Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 16, 6079-6086.

Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., *et al.* (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3369-3374.

Stieger, B. (2011). The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol*, 205-259.

Strautnieks, S.S., Kagalwalla, A.F., Tanner, M.S., Knisely, A.S., Bull, L., Freimer, N., Kocoshis, S.A., Gardiner, R.M., and Thompson, R.J. (1997). Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24. *Am J Hum Genet* 61, 630-633.

Suchy, F.J., and Ananthanarayanan, M. (2006). Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 *Suppl* 1, S10-16.

Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (2000). Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 251-260.

Tanaka, Y., Chen, C., Maher, J.M., and 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., and 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.

Teoh, N.C., and Farrell, G.C. (2003). Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 18, 891-902.

Trauner, M., Arrese, M., Lee, H., Boyer, J.L., and Karpen, S.J. (1998). Endotoxin downregulates 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., Koepffel, T.A., Schlosser, S.F., Suchy, F.J., Keppler, D., and Boyer, J.L. (1997). The rat

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

Trauner, M., and Boyer, J.L. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83, 633-671.

Trauner, M., Fickert, P., and Stauber, R.E. (1999). Inflammation-induced cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 14, 946-959.

Tsujimoto, T., Ogura, J., Kuwayama, K., Koizumi, T., Sasaki, S., Terada, Y., Kobayashi, M., Yamaguchi, H., and Iseki, K. (2013). Effect of oxidative stress on expression and function of human and rat organic anion transporting polypeptides in the liver. *Int J Pharm.*

Tsuyama, H., Shimizu, K., Yoshimoto, K., Nezuka, H., Ito, H., Yamamoto, S., Hasebe, K., Onishi, I., Muraoka, K., Ninomiya, I., *et al.* (2000). Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc* 32, 2310-2313.

Vos, T.A., Hooiveld, G.J., Koning, H., Childs, S., Meijer, D.K., Moshage, H., Jansen, P.L., and Müller, M. (1998). Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 28, 1637-1644.

Wagner, M., and Trauner, M. (2005). Transcriptional regulation of hepatobiliary transport systems in health and disease: implications for a rationale approach to the treatment of intrahepatic cholestasis. *Ann Hepatol* 4, 77-99.

Wanner, G.A., Ertel, W., Müller, P., Höfer, Y., Leiderer, R., Menger, M.D., and Messmer, K. (1996). Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 5, 34-40.

Warskulat, U., Zhang, F., and Häussinger, D. (1997). Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J Hepatol* 26, 1340-1347.

Wettstein, M., and Häussinger, D. (1997). Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology* 26, 1560-1566.

Yadav, S.S., Howell, D.N., Gao, W., Steeber, D.A., Harland, R.C., and Clavien, P.A. (1998). L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 275, G1341-1352.

Yadav, S.S., Sindram, D., Perry, D.K., and Clavien, P.A. (1999). Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 30, 1223-1231.

Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2005). Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2, 568-575.

Zhang, F., Warskulat, U., Wettstein, M., and Häussinger, D. (1996). Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology* 110, 1543-1552.

Zilles, Tillmann, Anatomie, 1. Auflage, Springer Verlag ;2010

Zollner, G., and Trauner, M. (2008). Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 12, 1-26, vii.