

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

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

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

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