

Aus dem Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Mit Zentraler Versuchstierhaltung

der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Die Regulation der hepatobiliären Transportproteine bei Behandlung der
Leberfibrose mit Darbepoetin α**



Inauguraldissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Elena Papenhagen,

Geboren am 23.08.1985 in Odessa, Ukraine

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Gisa Tiegs

Jahr der Einreichung: 2018

Tag der Verteidigung: 23.01.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Einleitung	2
2.1	Leberfibrose	2
2.1.1	<i>Allgemeines</i>	2
2.1.2	<i>Definition und Ätiologie</i>	2
2.2	Cholestase	4
2.2.1	<i>Definition und Diagnostik</i>	4
2.2.2	<i>Ätiologie und Pathogenese</i>	5
2.3	Therapieansätze bei Leberfibrose und Cholestase	6
2.4	Erythropoetin und Erythropoetin-Derivate	7
2.4.1	<i>Eigenschaften</i>	7
2.4.1.1	Hämatopoetische Wirkung.....	8
2.4.1.2	Anti-apoptotische und anti-inflammatorische Wirkung.....	8
2.4.1.3	Anti-fibrotische Wirkung.....	9
2.5	Darbepoetin α	9
2.5.1	<i>Struktur und Eigenschaften</i>	9
2.6	Hepatobiliäre Transporterproteine.....	10
2.6.1	<i>Allgemeines</i>	11
2.6.2	<i>Basolaterale Transporterproteine</i>	12
2.6.2.1	Natriumabhängiges Transportprotein (NTCP)	12
2.6.2.2	Natrium-unabhängige Transportproteine	12
2.7	Apikale Transportproteine	13
2.7.1	<i>BSEP</i>	14
2.7.2	<i>MRP Familie</i>	14
2.7.2.1	MRP2.....	15
2.8	Effluxproteine auf der basolateralen Membran.....	15
2.8.1	<i>MRP3</i>	15
2.8.2	<i>MRP4</i>	16
2.8.3	<i>MRP5</i>	16
2.9	Die Rolle der Transporterproteine bei Cholestase.....	17
3	Zielstellung der Arbeit	18
4	Material und Methoden	19
4.1	Versuchstiere	19
4.2	Modell der Gallengangsligatur.....	19

Inhaltsverzeichnis

4.3	Experimentelle Gruppen.....	20
4.4	Untersuchungstechniken.....	21
4.4.1	<i>Laborchemie (Vollblut- und Plasmaanalysen)</i>	21
4.4.2	<i>Histologie</i>	21
4.4.3	<i>Molekularbiologische Untersuchungen des Lebergewebes (RT-PCR)</i>	22
4.4.4	<i>Western Blot</i>	23
4.4.5	<i>Überlebensstudie</i>	24
4.4.6	<i>Statistik</i>	24
5	Ergebnisse	26
5.1	Parameter der biliären Fibrose.....	26
5.2	Expression der Transportproteine.....	27
5.2.1	<i>Influx über die basolaterale Membran</i>	27
5.2.2	<i>Efflux über die kanalikuläre Membran</i>	28
5.2.3	<i>Retrograder Efflux über die basolaterale Membran</i>	29
5.3	Expression von Lhx2 als Zeichen für die Aktivierung der Ito-Zellen und der Kollagenumverteilung nach BDL.....	30
5.4	Überlebensstudie.....	32
6	Diskussion	34
6.1	Diskussion von Material und Methoden.....	34
6.1.1	<i>Mausmodell</i>	34
6.1.2	<i>Modell der Gallengangsligatur</i>	34
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	35
6.2.1	<i>Regulation der hepatobiliären Transportproteine bei akuter Cholestase</i>	35
6.2.1.1	Regulation der basolateralen Transportproteine.....	35
6.2.1.2	Regulation der kanalikulären Transportproteine.....	37
6.2.2	<i>Der Einfluss von Darbepoetin alpha auf die Regulation der Transportproteine</i> ..	38
6.2.3	<i>Überlebensstudie</i>	41
7	Zusammenfassung und Ausblick	43
8	Thesen zur Dissertation	46
9	Abbildungsverzeichnis	47
10	Literaturverzeichnis	49
11	Danksagung	58
12	Selbstständigkeitserklärung	59

Abstract

1 Abstract

Aims: Darbepoetin- α (DPO), a long-acting erythropoietin analog, has been shown to protect the liver against cholestatic injury, to exert an antifibrotic effect, and to increase the survival time in a model of common bile duct ligation. Here we evaluate whether these tissue-protective effects are caused by DPO induced regulation of hepatobiliary transporters.

Main methods: C57BL/6J mice underwent common bile duct ligation and were treated with either DPO or physiological saline. Time dependent (2, 5, 14, 28 days after bile duct ligation) protein expression of different hepatobiliary transporters which have been established to play an important role in hepatocellular (i) bile acid uptake, (ii) bile acid excretion, and (iii) retrograde bile acid efflux were assessed. mRNA and protein expression of Lhx2, an important negative regulator of hepatic stellate cell activation, was determined.

Key findings: Saline treated cholestatic mice impress with increased mRNA expression of Lhx2 as a defense mechanism, while there is less need for such an upregulation in mice treated with DPO. Whereas Ntcp (slc10a1) protein expression is suppressed as early as 2 days after bile duct ligation to 40% in untreated animals, DPO treated mice exhibit decreased protein level not before day 5. Similarly, the steady decline of Mrp4 (abcc4) protein level during extrahepatic cholestasis in control treated animals does not occur upon DPO application. Significance: The collected data show that DPO affects expression of hepatobiliary transporters during obstructive cholestasis but do not provide sufficient evidence to demonstrate a direct correlation between this regulation and hepatoprotection by DPO.

Keywords: *Bile duct ligation, cholestasis, erythropoietin, slc10a1, abcc4*

Einleitung

2 Einleitung

2.1 Leberfibrose

2.1.1 Allgemeines

Leberfibrose/-zirrhose stellt nach wie vor das weltweit größte medizinische Problem dar, das mit signifikant hoher Morbidität und Mortalität einhergeht [Pauli-Magnus et al. 2006, Ishak & Zimmermann 1995, Parsons et al. 2008, Pinter et al. 2016]. Der aktuelle Stand über die Pathogenese der fibrotischen Lebererkrankungen basiert auf den wissenschaftlichen Erkenntnissen aus der Mitte des 20. Jahrhunderts, als die ersten mikroskopischen Veränderungen während der humanen Leberzirrhose unter experimentellen Bedingungen von Stowell 1951 beschrieben wurden [Stowell 1951]. Im Hinblick auf die molekularen Vorgänge bei der hepatischen Fibrose ist das Verständnis dieses Krankheitsbildes noch stark begrenzt. Demzufolge bleibt die Entwicklung effektiver Therapiestrategien erschwert [Sokol et al. 2006]. Eine evaluierte kausale medikamentöse Therapie der Leberfibrose existiert zum heutigen Tag noch nicht. Die orthotope Lebertransplantation stellt demnach die einzig mögliche etablierte kausale Therapie zur Behandlung der chronisch fibrotischen Lebererkrankungen dar [Bataller et al. 2005, Pinter et al. 2016].

2.1.2 Definition und Ätiologie

Bei den chronisch fibrotischen Lebererkrankungen handelt es sich um eine dynamische Wundheilungsreaktion des Gewebes auf die Persistenz der gewebstoxischen Schädigung, die in erster Linie durch inflammatorische Umbauvorgänge zur starken Matrixeinlagerung führt [Friedmann et al. 2003]. Infolge der dauerhaften Schädigung während der Hyperinflammation sterben die betroffenen Hepatozyten ab. Durch den Zellerfall werden bei der Nekroinflammation vermehrt Entzündungsmediatoren freigesetzt, die verschiedene Zellen dazu stimulieren, in das geschädigte Gewebe ein zu wandern, sich zu Kollagen produzierenden Myofibroblast-ähnlichen Zellen um zu wandeln sowie kontinuierlich die Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) zu produzieren. Diese Überexpression der EZM-Bestandteile hat einen parenchymatösen Umbau der Leberläppchenarchitektur zu Folge [Poli et al. 2000, Brenner et al. 2009, Jiao et al. 2009]. Der Übergang in das irreversible Endstadium, der Leberzirrhose, ist fließend. Es ist gekennzeichnet durch die Vernarbungsprozesse mit Ausbildung von Septen und Regeneratknötchen. Trotz

Einleitung

unterschiedlicher Ätiologien verläuft dieser Umbauvorgang bei den meisten chronisch fibrotischen Lebererkrankungen gleich. Der daraus resultierte gestörte Transport von Gallebestandteilen führt schließlich zur Leberfunktionsbeeinträchtigung [Friedmann et al. 2008, Benyon et al. 2000, Desmet et al. 2004, Poli et al. 2000, Pinter et al. 2016].

Einleitung

2.2 Cholestase

2.2.1 Definition und Diagnostik

Die Genese der hepatischen Lebererkrankungen ist vielfältig. Je nach einwirkender Noxe unterscheidet man zwischen toxischer, viraler, metabolischer, autoimmuner und cholestatischer Leberfibrose [Siegmund et al. 2005, Kuntz et al. 2008, Krawitt et al. 2006, Kaplan et al. 2005, Lucey et al. 2009, Penz-Österreicher et al. 2011]. Mit einer Häufigkeit von 5-15% ist die Cholestase die dritthäufigste Ursache für eine chronisch fibrotische Lebererkrankung [Kuntz Kuntz, 2008]. Sie stellt eine Galleflussbeeinträchtigung dar, die entweder durch Sekretionsstörung von biliären Komponenten aus dem Hepatozyten oder durch eine insuffiziente cholangiozellulärer Sekretion oder durch die mechanische Gallengangsobstruktion bedingt sein kann [Keppler et al. 2011]. Dadurch kommt es zur Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs. Der gestörte Transport von gewebstoxischen gallepflichtigen Bestandteilen führt zur Akkumulation dieser intrazellulär und im systemischen Kreislauf sowie zum Mangel an funktionell wichtigen Gallebestandteilen im Darm [Geier et al 2003; Kredel et al 2008, Trauner 2016, Pauli-Magnus 2006]. Das klinische Hauptsymptom der Cholestase ist der Ikterus. Durch die Ablagerung des Farbstoffes Bilirubin, einem Abbauprodukt des Hämoglobins, in der Haut entsteht eine gelbliche Verfärbung von Haut und Schleimhäuten. Der Sklerenikterus ist ab einer Serumbilirubinkonzentration von mehr als 35 µmol/l (= 2 mg/dl) sichtbar. Ferner bewirkt die Ansammlung von Gallensubstanzen in der Haut die Ausschüttung von Neurostimulatoren sowie anderen Peptiden aus den Mastzellen, den so genannten Histaminen, die den Schmerzreiz über die vordere Kommissur und den Traktus spinothalamikus in die unterschiedlichen Hirnareale leiten [Y.A. Tivoli et al. 2009]. Die Tabelle 1 fasst einige der klinischen und laborchemischen Parameter zusammen, die für die Diagnose der Cholestase im klinischen Alltag unentbehrlich sind. Sie sind wichtig für die Diagnostik, um den möglichen ätiologischen Hintergrund der Erkrankung zu verifizieren und zwischen einer intra- oder extrahepatischen Cholestase zu unterscheiden, um die entsprechende Therapie einzuleiten.

Klinische Zeichen		Laborchemische Zeichen	
Ikterus	Gelbfärbung von Haut/ Schleimhäuten und Skleren durch	GOT // GPT // GLDH	Enzymanstieg im Zytoplasma bei akuter Leberschädigung

Einleitung

	Ablagerung von Bilirubin im Gewebe		
Juckreiz	Aktivierung der Nervenfasern durch Bilirubin- und Gallensäureablagerungen in der Haut	Bilirubin	Abbauprodukt des Hämoglobins als Indikator für die Hämolyse und Eliminationsstörung in der Leber
Aszites	Flüssigkeitsaustritt in die Bauchhöhle aufgrund des verringerten kolloidosmotischen Drucks im Blut bei Lebersynthesestörung mit Albuminmangel	CHE // Albumin // Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren	Syntheseparameter in der Leber, verminderte Expression bei der Synthesestörung der Leber
Anämie	Blässe der Haut aufgrund der Blutarmut bei erhöhtem Verbrauch und/oder verminderter Produktion von roten Blutkörperchen	yGT // AP	Spezifische Cholestaseparameter, als Zeichen der Störung von Prozessen in den Gallenwegen

Tabelle 1: Klinische und laborchemische Parameter zur Diagnose einer Leberschädigung.

2.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Cholestase stellt eine entweder erworbene oder angeborene Beeinträchtigung in der Synthese oder des Flusses von Gallensäuren dar, die zur Unterbrechung des enterohepatischen Gallensäurekreislaufs und damit zur Akkumulation der potentiell toxischen Gallensäuren intrazellulär oder im großen systemischen Kreislauf führen [Trauner et al. 2016]. Das pathophysiologische Verständnis der Cholestase auf der molekularen Ebene ist erst durch die Entdeckung der ATP-abhängigen Transportproteine möglich [Trauner et al. 1997]. Die durch die Genmutation gestörte Funktion des BSEP-Transportproteins führt zur Akkumulation der Gallensäuren im Hepatozyten, das zur intrahepatischen Cholestase, besser bekannt als familiäre intrahepatische Cholestase Typ I-III, führt. Das Versagen der osmotischen Filtration im Gallebildungsprozess bei primären Hepatopathien oder primär nicht-hepatischen Erkrankungen mit hepatischer Mitbeteiligung durch Medikamente, Infektionskrankheiten oder Schwangerschaft stellen weitere Ursachen für eine nicht obstruktive intrahepatische Cholestase [Kredel et al. 2008]. Hingegen bedingt eine mechanische Verlegung von Gallenwegen durch Gallensteine oder

Einleitung

Tumorerkrankungen, wie einen Pankreaskopftumor, die extrahepatische Cholestase [Kredel et al. 2008]. Was genau sich auf der molekularen Ebene abspielt und wie sich die Transportproteine während der extrahepatischen Cholestase verhalten und beeinflusst werden ist, noch wenig erforscht.

2.3 Therapieansätze bei Leberfibrose und Cholestase

Eine möglichst umfangreiche Kenntnis der an den Prozessen während der Cholestase beteiligten Transportproteine ist die Voraussetzung nicht nur für ein tieferes Verständnis der hepatischen Biotransformation, sondern stellt eine Voraussetzung für die Entwicklung hepatoprotektiver Substanzen und damit möglicher therapeutischer Ansätze für die Behandlung der Lebererkrankungen dar. Als derzeit einzig anerkanntes Medikament zur Behandlung der cholestatischen Lebererkrankungen ist die Ursodeoxycholsäure (UCDA), die besonders bei der Behandlung der primären sklerosierenden Cholangitis angewandt werden darf [Kredel et al 2008]. Es handelt sich dabei um eine atoxische hydrophile Gallensäure, deren Wirkungsmechanismus jedoch noch nicht exakt entschlüsselt wurde und somit die klinische Effektivität weiterhin limitiert bleibt [Trauner et al. 2008]. Möglicherweise spielen hepatoprotektive, immunmodulatorische, membranstabilisierende und antiapoptotische Effekte sowie Veränderungen der Membrantransportproteine eine Rolle [Pausch & Gatzten 2006]. Sowohl am murinen als auch am Rattenmodell wurde die gewebsprotektive Wirkung von UDCA auf der molekularen Ebene durch die vermehrte Expression von BSEP- und MRP2-Transportproteinen nachgewiesen, jedoch nicht an der humanen Leber [Paumgartner et al. 2006].

Der Mangel an wissenschaftlichen Kenntnissen zur Ätiologie der Cholestase auf der molekularen Ebene erschweren die Erforschung und Etablierung kausaler Therapieansätze [Moreira 2007]. Zudem zeigen sich die ersten klinischen Symptome einer chronischen Lebererkrankung oft erst verspätet, im Stadium der Leberzirrhose, wenn das Lebergewebe zunehmend vom Bindegewebe ersetzt wurde. Die verspätete Diagnosestellung sowie multiple Genese dieses Krankheitsbildes erschweren zusätzlich die Entwicklung kausaler Therapiemöglichkeiten. Die einzige kausale Therapiemöglichkeit bis jetzt bleibt die Organtransplantation.

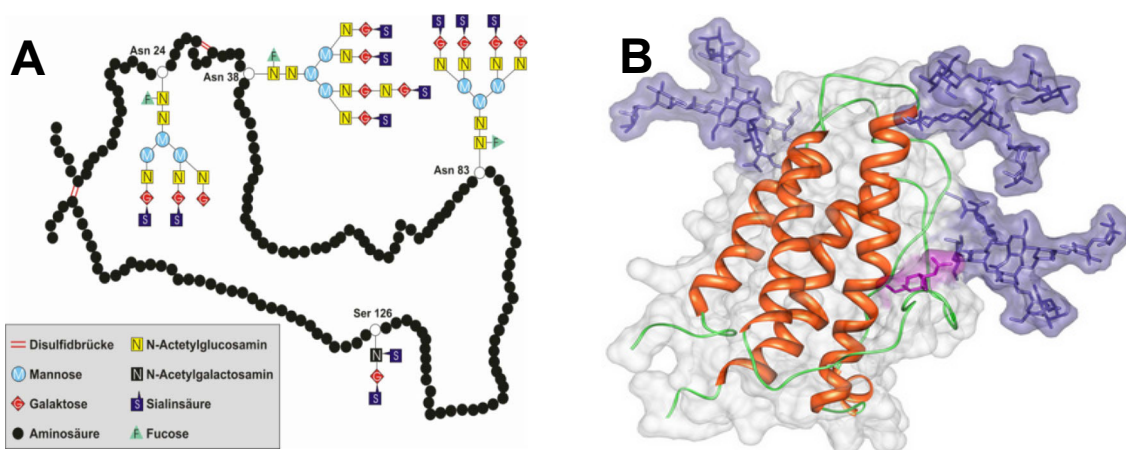
Einleitung

2.4 Erythropoetin und Erythropoetin-Derivate

Ein möglicher Ansatzpunkt für die Etablierung einer kausalen Therapie cholestatischer Lebererkrankungen ist neben der UDCA der Einsatz von Erythropoetin (EPO). In einer Reihe von Studien konnte bei verschiedenartigen Gewebsschädigungen die pleiotrope Wirkung von EPO demonstriert werden. Neben der gut untersuchten physiologischen Rolle von EPO in der Erythropoese konnten von Joyeux-Faure et al. 2007 weitere positive Eigenschaften wie anti-apoptotische, anti-inflammatorische sowie zellprotektive Effekte in verschiedenen Gewebearten nachgewiesen werden. Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Le Minh et al. haben erstmals belegt, dass die Gabe von Darbepoetin alfa (DPO α), einem Erythropoetinderivat, den akuten Leberschaden reduzieren kann [Le Minh et al. 2007]. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte dieser frühe anti-fibrotische Effekt am murinen Modell der Leberfibrose sowohl experimentell als auch histologisch nachgewiesen werden [Sigal et al. 2010]. Auf molekularer Ebene wird der kausale Ursprung des anti-fibrotischen Effekts von EPO in einem Eingriff in die Regulation der hepatobiliären Transportproteine vermutet. Damit ist es naheliegend, dass EPO und seine Derivate noch höhere Relevanz im klinischen Alltag bei der Behandlung der Leberfibrose bekommen, wenn die genaueren Mechanismen der Regulation der Transportproteine bei der Cholestase auf der molekularen Ebene erforscht und geklärt sind.

2.4.1 Eigenschaften

Das Hormon Erythropoetin wird im adulten Körper überwiegend in der Niere produziert und spielt als Wachstumsfaktor eine entscheidende Rolle bei der Stimulation der Erythropoese [Lappin 2003].



Einleitung

Abbildung 1: Die primäre Struktur (A) und die Globusformation aus vier Helices (B) von Erythropoetin. Quelle: Lappin, 2003.

2.4.1.1 Hämatopoetische Wirkung

EPO gehört zur Familie der Klasse-1-Zytokine und induziert die Proliferation sowie die Differenzierung von Erythrozyten [Jelkmann et al. 2004]. Der primäre Auslöser für die vermehrte Transkription von Erythropoetin ist dabei die Hypoxie. In Folge deren wird der hypoxieinduzierte Faktor HIF-1 aktiviert und vermehrt EPO produziert [Brines & Gerami 2008]. Erythropoetin bindet an seinen spezifischen transmembranen EPO-Rezeptor und aktiviert durch die Konformationsänderung innerhalb des cytoplasmatischen Rezeptorbereichs die Januskinase (JAK-2). Diese katalysiert wiederum ihre eigene Tyrosinphosphorylierung. Es wird eine Kaskade an Reaktionen ausgelöst, die über den JAK-STAT (Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator)-Signalweg direkt zur Transkription der jeweiligen Gene im Zellkern beiträgt. Sie führt zur Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen zur Bildung von Erythrozyten, die einen effizienteren Sauerstofftransport ermöglichen [Jelkmann et al. 2004]. Diese Erkenntnisse werden in der Medizin zur Behandlung von unterschiedlichen Anämieformen verwendet, etwa bei einer renalen oder durch eine Chemotherapie induzierten Anämie [Eckardt et al. 2001, Dunst et al. 2004].

2.4.1.2 Anti-apoptotische und anti-inflammatorische Wirkung

Erythropoetin wird in der fetalen Periode überwiegend von der Leber synthetisiert. Es existieren zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten, die beweisen, dass viele Organe bei entsprechender Stimulation auch nach der Geburt dieses Hormon produzieren können [Jelkman et al. 2004]. Joyeux-Fauve et al. wiesen 2007 seine anti-apoptotische Wirkung mit anti-inflammatorischem Potential nach [Joyeux-Fauve et al. 2007]. Im Mausmodell konnte Sorg et al. in seinen Arbeiten diesen positiven Effekt von EPO auf die Wundheilungsprozesse veranschaulichen. Sie zeigten eine beschleunigte Epithelisation und Differenzierung des mikrovaskulären Blutgefäßsystems [Sorg et al. 2009]. Da sich die Interaktion des Erythropoetins nicht nur auf die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 beschränkt, sondern auch das Protein NFκB beeinflusst, das die Synthese der pro-apoptotischen Proteine beeinflusst, spricht man sowohl von anti-inflammatorischen als auch anti-apoptotischen Eigenschaften von EPO [Youssofian et al. 1993, Sasaki et al., 2000, Lappin et al. 2003, Ghezzi und Brines 2004].

Einleitung

2.4.1.3 Anti-fibrotische Wirkung

Die anti-fibrotische Wirkung von EPO beschränkt sich nicht nur auf die Leber. Sowohl am Herz als auch am renalen und pulmonalem Gewebe konnte der positive Effekt von EPO gezeigt werden [Yamada et al. 2012]. In den Ergebnissen der eigenen Gruppe zeigte EPO auch bei der frühen Ausbildung der Leberfibrose einen protektiven Effekt. Im Rahmen von Überlebensstudien am murinen Modell der Gallengangsligatur zeigte sich ein signifikanter zytoprotektiver Effekt des EPO-Derivats DPO α auf die Leberfibrose. Damit konnte die antifibrotische Wirkung von DPO α bei der akuten Leberfibrose bewiesen werden. Der genauere Mechanismus seiner Wirkung auf der molekularen Ebene ist jedoch nicht geklärt.

2.5 Darbepoetin α

Humanerythropoetinanaloga werden bereits seit mehr als 30 Jahren zur Behandlung von Anämien verwendet. DPO α gehört zu den EPO-Derivaten, das am häufigsten zu den wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt wird und damit zu den bekanntesten zählt [Sinclair et al. 2013].

2.5.1 Struktur und Eigenschaften


Formel	C₈₁₅H₁₃₁₇N₂₃₃O₂₄₁S₅
Gruppe	Peptide
Struktur	
Gewicht	37'000 Dalton

Tabelle 2: Allgemeine Daten zur Struktur und zu den Eigenschaften von Darbepoetin alfa.

DPO α ist ein gentechnologisch hergestelltes Glykoprotein aus 165 Aminosäuren. Es handelt sich um ein hyperglycosyliertes Analogon von humanem Erythropoetin, das zur Behandlung sowohl von chronisch renalen als auch

Einleitung

chemotherapiebedingter Anämieformen entwickelt wurde. Die Entwicklung von DPO α basiert auf dem Umstand, dass sich die Halbwertszeit durch die Glycolysierung der N-terminalen Enden des Erythropoetins verlängert. Es handelt sich dabei um ein Protein, das der Struktur von EPO sehr ähnelt und an den zwei N-terminalen Enden zusätzlich hyperglycolysiert ist. Damit besteht das DPO α im Unterschied zu EPO aus insgesamt fünf hyperglycolysierten Enden, woraus sich auch Auswirkungen auf das Gewicht des Moleküls ergeben. Dieses erhöht sich von 30,4 kDa auf 37,1 kDa. Gleichzeitig verlängert sich aufgrund seiner Größe die Halbwertszeit, die das Dreifache vom EPO beträgt. Durch diese Eigenschaft wird das DPO α nicht nur bei der Behandlung von Anämien, sondern auch in der Forschung bevorzugt eingesetzt. Beispielhaft hierfür ist auch die vorliegende Studie zur Untersuchung der antifibrotischen Wirkung von EPO bei der Behandlung der Leberfibrose und die Auswirkungen auf die Regulation der Transportproteine [Sinclair et al. 2013, Macdougall et al. 2007, Egrie et al. 2001, Ots et al. 2008, Glaspy et al. 2010, Glaspy et al. 2011].

2.6 Hepatobiliäre Transporterproteine

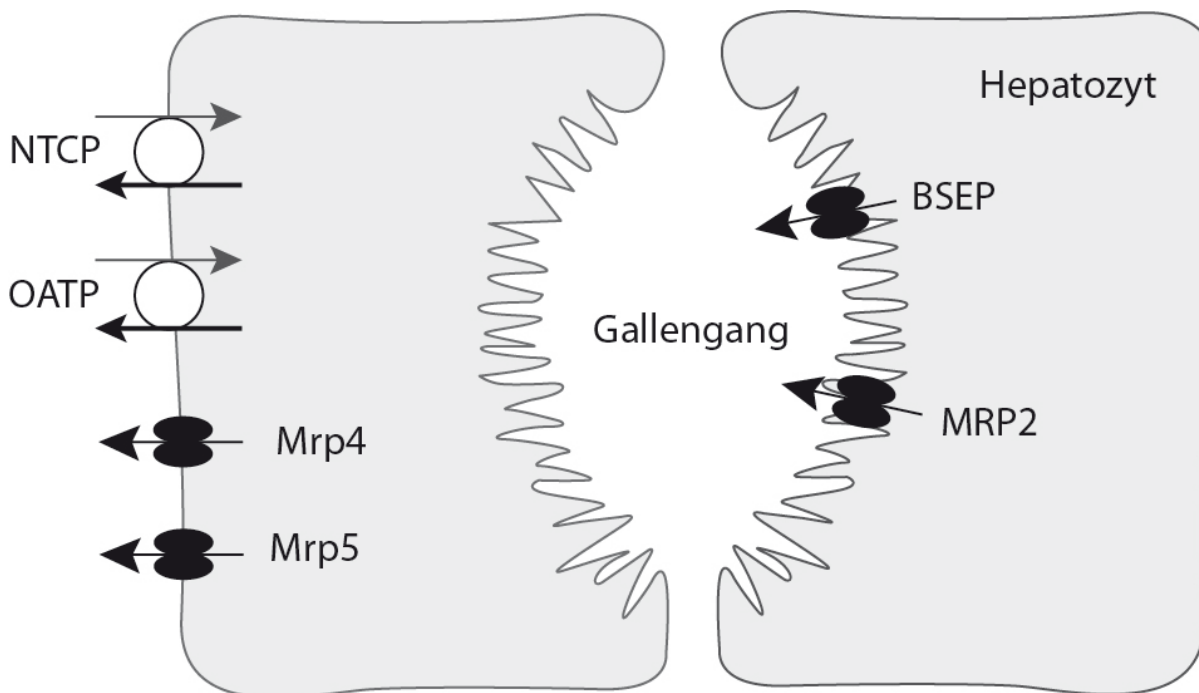


Abbildung 2: Schematische Darstellung der hepatobiliären Transporterproteine auf der basolateralen Seite (NTCP, OATP, Mrp4 und Mrp5) sowie auf der apikalen Membran (BSEP und Mrp2). Modifiziert nach Kepler et al., 2011.

Einleitung

2.6.1 Allgemeines

Die Transportproteine dienen zur Regulation der Gallensekretion auf der molekularen Ebene. Der Hepatozyt ist eine polarisierte Zelle mit einem dem Blut zugewandten sinusoidalen (basolateral) und einem dem Gallenkanälchen zugewandten kanalikulären (apikalen) Pol, die den gezielten Gallensäuretransport aus dem Blut in die Galle ermöglichen. Dementsprechend befinden sich die Transportproteine sowohl auf der sinusoidalen als auch auf der kanalikulären Seite der Hepatozytenmembran und werden entsprechend ihrer Lokalisation in basolaterale und apikale Transportproteine eingeteilt [Trauner et al. 2003]. Die erste Aufteilung der Transportproteine in zwei Gruppen wurde von Boyer et al. in den neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben. Bei der Gallensynthese sind sie für die Aufnahme von Gallensäuren und deren Stoffwechselprodukte nach Metabolismusvorgängen aus dem Blut verantwortlich und sezernieren diese anschließend über die kanalikuläre Hepatozytenmembran wieder in die Gallenkanälchen. Die anschließende Modifizierung und Komplementierung der Galle erfolgt in den Ductuli, in denen zusätzlich die Bildung der bikarbonatreichen Flüssigkeit erfolgt, die für die Funktion der Galle unerlässlich ist.

Eine weitere Einteilung der Transportproteine basiert auf deren Energieverbrauch. Neben den energieunabhängigen Transportproteinen, die für ihre Funktion nach dem osmotischen Gesetz ein Gradientengefälle brauchen, ist die Vielzahl der bei der Cholestase beteiligten Transportproteinen energieabhängig [Trauner et al. 1997, Trauner et al. 2003, Roma et al. 2008, Pierre et al. 2001]. Die in der aktuellen Studie untersuchten Transportproteine sind energieabhängig und unterliegen gewissen Regulationsmechanismen. Über die Mechanismen deren Regulation ist nur wenig bekannt. Die Kenntnis über die Transportproteine und deren Aufgaben bei der Cholestase ist besonders für das tiefere Verständnis der Veränderungen im Hepatozyt während der Leberfibrose elementar. Ein chronischer Rückstau von Galle in die Leber und somit die Auslösung der Cholestase mit der daraus folgenden Ausbildung einer Leberfibrose ließen sich so möglicherweise verhindern.

Einleitung

2.6.2 Basolaterale Transporterproteine

Basolaterale Transporterproteine befinden sich auf der sinusoidalen Hepatozytenmembran und sind mit Ausnahme von MRP-Familie für die Aufnahme der Metaboliten in die Zelle verantwortlich.

2.6.2.1 Natriumabhängiges Transportprotein (NTCP)

Das NTCP ist der wichtigste Vertreter der basolateralen Aufnahmetransporter (Influxproteine) und für den Transport der meisten Menge an Gallensäuren zuständig [Klaasen et al 2010]. Von dem Gesamttransport der Gallensäuren über die basolaterale Membran übernimmt NTCP 80% der konjugierten und 50% der unkonjugierten Gallensäureaufnahme [Pauli-Magnus et al 2006]. Als einziges natriumabhängiges Transportprotein ist es für die Aufnahme von einwertigen Gallensäuren zuständig wie beispielsweise Taurocholatsäure [Müller und Jansen 1997]. Deshalb wird das NTCP auch Taurocholot-cotransportierendes Polypeptid bezeichnet. Kullak-Ublick et al. haben 2000 gezeigt, dass NTCP bei allen untersuchten Spezies lediglich auf der basolateralen Membran des Hepatozyten vorkommt. Im murinen Model existieren zwei Isoformen dieses Proteins. Aufgrund der identischen Lokalisation der beiden ist deren Unterscheidung für die Forschung ohne Bedeutung. Das murine NTCP1 besteht aus 362 Aminosäuren und wiegt ca. 51 kDa, das murine NTCP2 dagegen ist ein trunkiertes Protein aus 317 Aminosäuren. Sein C-terminales Ende liegt intrazellulär, das N-terminale extrazellulär. Beim Menschen besteht das NTCP aus 349 Aminosäuren und ist 56 kDa schwer [Kullak-Ublick et al. 2000, Alrefai & Gill 2007].

2.6.2.2 Natrium-unabhängige Transportproteine

Zu der zweitwichtigsten Gruppe der basolateralen Influxproteine gehören die Natrium-unabhängigen Transportproteine der OATP (Organic anion transporting polypeptides)- und der ABC-Familie. Den ersten Vertreter der OATP Familie hat die Forschungsgruppe von Jacquemin et al. 1994 aus der Ratte isoliert und kodiert [Jacquemin et al 1994]. Es sind mehr als 160 Isoformen bekannt, wobei nur wenige davon in Ihrer Funktion gut erforscht sind. Sie kommen neben der Leber auch in der Niere und im Gehirn vor [Esteller et al. 2008, Kullack-Ublick et al. 2001]. Von den 160 Isoformen sind 11 humane bekannt, die weiterhin in 6 Subgruppen unterteilt werden

Einleitung

(OATP1-6). Nur 2 Vertreter davon sind leberspezifisch und am meisten vertreten, i.e. der OATP1B3 und OATP1B1 [Hagebuch et al. 2001, Pauli-Magnus et al. 2006].

Der Aufbau von OATP Transportproteinen ist sehr charakteristisch. Sie bestehen aus ca. 670 Aminosäuren, die zu insgesamt zwölf Transmembrandomänen angeordnet sind, wobei sowohl die 7 N-terminalen als auch das C-terminale Ende im Zytoplasma lokalisiert sind. Die größte Domäne und für die Transportfunktion die wichtigste stellt der extrazelluläre loop 5 dar [Hagebuch 1997, Kullack-Ublick 2000]. Der Transport der Gallensäuren findet im Austausch gegen Hydrogencarbonat (HCO_3), Glutathion (GSH) oder anderen Gallensäuren statt [Esteller et al. 2008] und scheint in seiner Funktion dadurch multidirektional zu sein [Kullack-Ublick et al. 2000]. Das Substratspektrum von OATP ist im Gegensatz zu dem von NTCP deutlich vielseitiger und beinhaltet neben den organischen Anionen und amphiphatischen Verbindungen auch Kationen, zu denen Gallensäuren, Steroidkonjugate, Schilddrüsenhormone, anionische Oligopeptide, verschiedene Toxine sowie zahlreiche Medikamente zählen [Hagebuch & Meier 2004, Klaasen & Aleksunes 2010, Kullack-Ublick et al. 2000, Pauli-Magnus et al. 2006]. Nur das unkonjugierte Bilirubin kann von den Vertretern der OATP-Familie nicht transportiert werden [Müller & Jansen 1997]. Kullack-Ublick et al. haben im Jahr 2000 das am stärksten exprimierte OATP in der humanen Leber beschrieben, das humane OATP-C. Es kommt nur auf der sinusoidalen Membran vor und besteht aus 691 Aminosäuren. Mit 64 % Aminosäureidentität existiert die größte Ähnlichkeit zum OATP der Ratte [Kullack-Ublick et al. 2000]. Der OATP-C transportiert ausschließlich Anionen und ist das wichtigste humane Natrium-unabhängige Aufnahmetransportprotein für die Gallensäuren. Die Veränderung seiner Expression bei der Cholestase wurde in der vorliegenden Studie untersucht.

2.7 Apikale Transportproteine

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der hepatobiliären Sekretion von Gallensäuren ist die kanalikuläre Sekretion, d.h. aus dem Hepatozyt in die Gallenkanälchen. Die Konzentration von Gallensäuren kanalikulär beträgt das 1000fache von der im Hepatozyten. Folglich handelt es um einen aktiven Transport durch die kanalikuläre Membran [Kullack-Ublick et al. 2000]. Mit einer einzigen Ausnahme gehören die apikalen Transportproteine alle zu der Familie der ABC (ATP-Binding-cassette)-Transportproteinen. Dabei wird die Sekretion von organischen

Einleitung

Anionen und Gallensäuren in erster Linie durch BSEP und MRP2 ermöglicht [Hagenbuch et al. 2001].

2.7.1 BSEP

BSEP (bile salt export pump) ist dabei das Schlüsselprotein für die Sekretion der Gallensäuren aus dem Hepatozyten in den Gallengang [Klaasen & Aleksunes. 2010, Stieger et al. 20010 und 2011]. Das zur Familie der ABC-Transporter gehörende Protein BSEP der Maus ist zu 90 % mit dem humanen BSEP identisch, ca. 160 kDa groß und ausschließlich auf der apikalen Seite lokalisiert [Lam & Soroka 2010, Ho et al. 2010, Kis et al. 2009, Stieger et al. und 2011]. Sein primäres Substratspektrum sind die monovalenten Gallensäuren, während das MRP2 für die Sekretion der divalenten Gallensäuren zuständig ist [Hisamitsu et al. 2009, Ho et al. 2010]. Ist seine Funktion gestört, führt es zur intrahepatischen Cholestase [Lam & Soroka et al. 2010]. Die Inhibition von BSEP führt also zur reduzierten Gallensäuresekretion und damit zum verringerten Gallefluss, sprich zur Cholestase [Stieger et al. 2010 und 2011]. Als Schlüsselprotein im enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren ist die Kenntnis über seine Regulation und deren Beeinflussung von enormer Bedeutung.

2.7.2 MRP Familie

Zusammen mit dem BSEP gehört auch die MRP-Familie (Multidrug Resistance-associated Proteins) zu den Efflux-Transportproteinen. Diese Gruppe beinhaltet zehn Vertreter [Xinsheng et al. 2010]. Die Lokalisation dieser Transportproteine ist unspezifisch und fast ubiquitär. Sie sind sowohl auf der basolateralen als auch auf der apikalen Seite der bipolaren Zellen zu finden. Sie sind für den Export der organischen Anionen zuständig, aber auch endogene Proteine wie Leukotriene, Bilirubinglucoronide, Gallensäuren sowie Prostaglandine werden von MRP-Vertretern befördert. In ihrem Aufbau haben alle MRP-Vertreter die transmembrane Domänen Walker A und Walker B gemeinsam, welche für die ATP-Bindung unerlässlich sind. Die Transportproteine MRP1, 2, 3, 6 und 7 sind aufgrund der zusätzlichen transmembranen Domäne größer als bei den anderen MRP-Vertretern. Das Besondere dabei ist, dass ihre N-terminalen und C-terminalen Enden sich sowohl intra- als auch extrazellulär befinden. Die kleineren MRP4, 5, 8 und 9 haben stattdessen nur 2 Domänen, die in der Plasmamembran gespannt sind und deren beide Enden (das N-

Einleitung

terminale und C-terminale) intrazellulär angeordnet sind [Klaasen & Aleksunes et al. 2010].

2.7.2.1 MRP2

Das MRP2-Vertreter stellt den wichtigsten organischen Anionentransporter auf der kanalikulären Membran dar [Kool et.al. 1997]. Dieses Transporterprotein ist jedoch nicht leberspezifisch und kommt in geringeren Konzentrationen auch in den Nieren, Ileum und Duodenum vor [Paulusma & Elferink 1997]. Es ist das einzige MRP-Efflux-Transportprotein, das auf der apikalen Seite der bipolaren Zelle lokalisiert ist. Das MRP2-Protein transportiert das konjugierte Bilirubin und andere organische Anionen, wie Glutathion-, Sulfat- und Glucuronid-Konjugate, aber auch viele Cytostatika aus der Zelle hinaus. Das humane MRP2 besteht aus 1541 Aminosäuren. Seine 12 Transmembran-Domänen sind dabei so angeordnet, dass nach dem extrazellulären N-terminalem Ende vorerst eine einzelne, Membran assoziierte Region angeordnet ist, der ein Segment aus fünf und zuletzt ein Segment aus sechs membranassoziierten Regionen folgt [Kast & Gros 1997]. Die Hauptaufgabe von MRP2 ist die Glucuronisierung und Detoxikation der Zelle sowohl für endo- als auch für exogene Metabolite [Xinshenget al. 2010].

Alle anderen Transportproteine der MRP-Familie befinden sich auf der basolateralen Membranseite einer bipolaren Zelle.

2.8 Effluxproteine auf der basolateralen Membran

2.8.1 MRP3

MRP3-Transportprotein ist zum größten Teil in der Leber lokalisiert ist. In geringerem Ausmaß ist es jedoch auch im Darm, Pankreas, Nebennieren und Niere zu finden [Borst et al. 1999, Klaasen & Aleksunes 2010]. Das MRP3-Transporterprotein befindet sich im Gegensatz zu dem MRP2 auf der basolateralen Seite des Hepatozyten und kann damit als Gegenspieler zum MRP2-Transportprotein betrachtet werden. Es wird erst bei der Dysregulation von MRP2 überexprimiert und scheint damit bei der Cholestase eine wichtige Rolle zur Entgiftung der Zelle als Selbstschutzmechanismus zu spielen [Pfeifer et al 2014]. Es handelt sich um ein Transportprotein, das vor allem für den Transport von endogenen Glykuronid-Konjugaten und konjugierten Metaboliten verantwortlich ist.

Einleitung

2.8.2 MRP4

Ein weiterer Vertreter der MRP-Familie, der auf der basolateralen Hepatozytenmembran zu finden ist, ist das MRP4-Transportprotein. Es kommt neben der Leber auch in Prostata, Lunge, Muskelgewebe, Pankreas, Testes, Ovarien, Harn- und Gallenblase vor [Borst et al. 1999]. MRP4 ist besonders für den Transport von endogenen Molekülen wie Leukotriene und Prostaglandine, Folate, Gallensäuren und Urate zuständig. Die Expressionsanalysen des in der Leber exprimierten MRP4 haben gezeigt, dass diese Exportpumpe unter cholestatischen Bedingungen signifikant hochreguliert wird. Sie belegen somit die mögliche Rolle dieses Transporters beim Schutz des Hepatozyten unter den pathologischen Bedingungen einer Cholestase, indem es Gallensäuren über die basolaterale Membran ins Blut transportiert [Klaasen & Aleksunes 2010]. Aufgrund der Beförderung von Leukotrienen und Prostaglandinen lässt es sich vermuten, dass MRP4 einen Einfluss auf die Regulation von Inflammationsprozessen besitzt.

2.8.3 MRP5

MRP5 konnte in geringer Menge ubiquitär nachgewiesen werden und wird vorwiegend im Gehirn exprimiert, kommt aber auch in der Leber, Plazenta, im Urogenitaltrakt und in den Epithelzellen der Urethra vor [Nies et al. 2006]. Es befindet sich auf der basolateralen Hepatozytenmembran und ähnelt in seiner Struktur dem MRP1-Transporter [Borst et al. 1999, Borst 2000 Review]. Das Substratspektrum von MRP5 ist mit dem von MRP4 gleich. Dazu gehören neben den Gallensäuren die cyclischen Nukleotide wie cGMP und cAMP [Maher et al. 2005] und Nukleotidanaloga [Xinsheng et al. 2010]. Die genauere physiologische Funktion von MRP5 ist noch unklar [Xinsheng et al. 2010]. Es ist sowohl für den Efflux der endogenen als auch exogenen Substrate zuständig. Während die Expression von MRP4 und MRP5 in der gesunden Leber zu vernachlässigen ist [Maher et al. 2005, Xinsheng et al. 2010], steigt die Expression dieser Transporter während der Leberschädigung wie bei PBC signifikant an [Barnes & Aleksunes 2007]. Die Überexpression von MRP4 und MRP5 könnte somit als Antwort auf die Leberschädigung während der Cholestase angesehen werden und der Cholestase direkt entgegenwirken.

Einleitung

2.9 Die Rolle der Transporterproteine bei Cholestase

Die Veränderungen in der Expression von Transportproteinen unter cholestatischen Bedingungen, wie von MRP4 und MRP5, könnten mögliche primäre gewebsschutzmechanismen des Hepatozyten als Antwort auf die Schädigung darstellen. Die Beeinflussung der Expression von MRP2 und BSEP beim Effluxtransport würde der Cholestase direkt entgegenwirken. Die Kenntnis über diese Transporter, deren Regulationsmechanismen aber auch deren Beeinflussung würden neue Erkenntnisse und Möglichkeiten zur Evaluierung neuer Therapieansätze für dieses Krankheitsbild ermöglichen, mit dem Ziel, den chronischen Rückstau von Galle in der Leber und damit auch die Ausbildung der Leberfibrose auf der molekularen Ebene zu verhindern.

Zielstellung der Arbeit

3 Zielstellung der Arbeit

Die neuartigen Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Leberfibrose und hier insbesondere zur Bedeutung hepatobiliärer Transportproteine ermöglichen die Erprobung und Erforschung neuer Therapieansätze, die entweder in den pro-fibrotischen Prozess selbst eingreifen und die Fibrose zu verhindern versuchen oder jedoch direkt die Aktivierung der Fibroblasten modulieren [Ghiassi-Nejad & Friedman 2008]. Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Nutzung des etablierten in-vivo-Modells der extrahepatischen Cholestase die Regulation von hepatobiliären Transportern auf molekularer Ebene zu evaluieren, um so unsere Kenntnisse zur Relevanz dieser Prozesse bei der Leberfibrosierung wesentlich zu erweitern.

Weiterhin sollte unser Wissen zu den durch unsere Arbeitsgruppe kürzlich nachgewiesenen anti-fibrogenen Eigenschaften von Darbepoetin α komplettiert werden. Ein besseres Verständnis von der Protektion zugrundeliegenden Mechanismen bildet die Basis zur möglichen Etablierung dieser Substanz als klinisches Therapeutikum bei cholestatischen und fibrotischen Lebererkrankungen und könnte das Anwendungsspektrum auch auf andere Krankheitsbilder erweitern.

Hierzu sollten folgende zentrale Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann die durch unsere Arbeitsgruppe [Sigal et al. 2010] gezeigte protektive Wirkung bei prophylaktischer Applikation von DPO α auch bei therapeutischer Gabe reproduziert werden? Führt die therapeutische Gabe zu einem Überlebensvorteil der Versuchstiere bei Leberfibrose nach obstruktiver Cholestase?
2. Die protektive Wirkung von DPO α ist wahrscheinlich in erster Linie auf eine frühe Unterdrückung der pro-fibrotischen Kaskade zurückzuführen [Sigal et al. 2010]. Welche Konsequenz haben diese Effekte auf die Ausprägung des Leberschadens bei fortgeschrittener Fibrose. Hierzu wurde der Untersuchungszeitraum von 14 Tage auf 28 Tage verlängert.
3. Wird die bereits nachgewiesene protektive Wirkung von DPO α durch eine Regulation hepatobiliärer Transportproteine vermittelt?

Material und Methoden

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche 6 bis 10 Wochen alte C57BL/6J Mäuse mit einem Körpergewicht von 22-25 g verwendet. Diese entstammten einer Zuchthaltung vom Charles River Labor (Sulzfeld, Deutschland). Die Versuchstiere wurden 4-5 Tage vor und unmittelbar nach den Untersuchungen in einem klimatisierten Raum (konstante Raumtemperatur um 22-24°C, Luftfeuchtigkeit von 60%) der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock unter Erhaltung eines 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus untergebracht. Täglich wurden die Tiere visitiert und mit frischem Wasser, sowie dem Standardlaborfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest Deutschland) versorgt.

Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz, sowie der international geltenden Bestimmungen und der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

4.2 Modell der Gallengangsligatur

Das Modell der extrahepatischen Cholestase wurde durch die Durchtrennung des Ductus choledochus operativ simuliert. Die Gallengangsligatur wurde unter der vollständigen Sedierung der Tiere durchgeführt. Die Einleitung der Anästhesie erfolgte via Inhalation von einem Gasgemisch aus Sauerstoff und Isofluran (5% vol.). Dafür wurden die Tiere in eine durchsichtige Ganzkörperkammer gesetzt, welche an ein Narkosegerät (Sulla 808 Inhalations-Narkosegerät, Dräger AG, Lück, Deutschland) angeschlossen war. Nach Erreichen der gewünschten Narkosetiefe wurden die Tiere auf eine Präparationsheizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing Deutschland) umgelagert, um die Auskühlung zu vermeiden. Für die Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde den Versuchsmäusen eine speziell angefertigte Kunststoffmaske mit Absaugvorrichtung aufgesetzt, um einen kontinuierlichen Gasgemischfluss in einer Dosierung von 1,5 % vol. Isofluran und 1,5 l/min. Lachgas gewährleisten zu können. Die Augenlider wurden mit einer Dexpanthenolsalbe bedeckt, um die Austrocknung zu verhindern. Vor der medianen Laparotomie mittels einer Mikropräparationsschere wurde der Bauch elektrisch rasiert und mit Providonjod desinfiziert. Der Zugang zum Ligamentum hepatoduodenale konnte mittels hyperlordoser Haltung der Tiere erleichtert werden. Dafür wurde ein Kunststoffröhrchen unter die Wirbelsäule der Tiere platziert. Unter einem Stereomikroskop (Leica M651/655, Leica Microsystem AG

Material und Methoden

Heerbrugg Schweiz) wurde der Ductus choledochus im Ligamentum hepatoduodenale dargestellt und vorsichtig freipräpariert. Mittels dreifacher Ligatur zwischen den beiden distalen Enden wurde dieser anschließend durchtrennt. Die proximale doppelte Ligatur verhinderte den Galleabfluss, die distale unterbindete den Austritt von Darminhalt und damit die Infektion der Bauchhöhle. Am Ende des Eingriffes wurde die Bauchhöhle mit erwärmter physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Bauchdecke, sowie die Haut mittels einer fortlaufenden Nahttechnik mit Prolene 5.0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Wunde wurde erneut desinfiziert und mit einem Pflasterspray versorgt. Auf dem Rücken der Tiere wurde ein Depot mit physiologischer Kochsalzlösung gesetzt, um den Flüssigkeitsausgleich nach intraoperativem Verlust zu gewährleisten. Postoperativ wurden die Tiere zum Aufwachen aus der Narkose in einem Käfig der Rotlichtlampe für eine bis zwei Stunden ausgesetzt, um den Wärmeverlust zu vermeiden.

4.3 Experimentelle Gruppen

Die aktuell vorliegende Studie wurde in zwei Teilabschnitte unterteilt.

a). Wirkung von DPO α auf die Regulation der Transportproteine während einer akuten Leberschädigung.

Um die Auswirkung von Erythropoetin auf die Expression der Transportproteine während der extrahepatischen Cholestase zu untersuchen, wurde das Lebergewebe der Versuchstiere verwendet, die 24 h nach der Operation (BDL) repetitiv alle 72 h der Behandlung unterzogen und jeweils am 2., 5. 14. und den 28. Tag für die Gewebsuntersuchungen geopfert wurden. Es erfolgte die Randomisierung in folgende Gruppen:

- DPO-Gruppe: Es erfolgte die Applikation von 10 $\mu\text{g}/\text{kgKG}$ DPO α (Aranesp, Amgen, München, Deutschland) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (1 μg DPO α in 10 ml NaCl/kg KG) 24 h nach der Operation. Die Behandlung wiederholte sich jeden dritten Tag. Jede Gruppe beinhaltete pro Untersuchungszeitpunkt jeweils 10 Tiere, d.h. insgesamt 40 Tiere.
- NaCl-Gruppe/Kontrollgruppe: Das Behandlungsschema war identisch zu der DPO-Gruppe. Anstatt des DPO α wurde jedoch nur die physiologische Kochsalzlösung, auf das entsprechende Applikationsvolumen gebracht, verabreicht.

Material und Methoden

- Sham-Gruppe: Insgesamt wurden 6 Tiere einer Scheinoperation (Sham) unterzogen, um die Veränderungen neben der Gallengangligatur zu erfassen. Dafür wurde in Vollnarkose eine Laparotomie sowie die Darstellung der Ductus choledochus, jedoch nicht dessen Durchtrennung durchgeführt. Anschließend wurde die Bauchdecke verschlossen und es erfolgte die Applikation von Kochsalzlösung entsprechend dem bei der Kontrollgruppe genannten Schema.

b). Überlebensstudie zur Beurteilung der Wirkung von DPO α in therapeutischer Gabe bei chronischer Leberschädigung

Für die Überlebensstudie wurden die Versuchstiere nach der BDL jeden dritten Tag ab dem 7. postoperativen Tag behandelt. Der Zustand der Tiere wurde täglich und das Gewicht jeden dritten Tag kontrolliert. Nach der Operation erfolgte eine gleichmäßige verblindete Randomisierung der Tiere in folgende Gruppen:

- DPO-Gruppe: Es erfolgte die Applikation von 10 $\mu\text{g}/\text{kgKG}$ DPO α (Aranesp, Amgen, München, Deutschland) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (1 μg DPO α in 10 ml NaCl/kg KG) ab dem 7. postoperativen Tag. Die Behandlung wiederholte sich jeden dritten Tag. Die Gruppe beinhaltete 15 Tiere.
- NaCl-Gruppe/Kontrollgruppe: Das Behandlungsschema war identisch zu der DPO-Gruppe. Anstatt des DPO α wurde jedoch nur die physiologische Kochsalzlösung, auf das entsprechende Applikationsvolumen gebracht, verabreicht. Diese Gruppe beinhaltete 15 Tiere.

4.4 Untersuchungstechniken

4.4.1 Laborchemie (Vollblut- und Plasmaanalysen)

Bilirubin kann als Cholestasemarker spektromorphometrisch bestimmt werden. Unter der Zugabe eines Akzelerators reagiert das Abbauprodukt von Häm mit einer diazotierten Sulfanilsäure. Dabei entsteht eine auffällig rote Farbe. Mittels des Hitachi 704 Automatic Analyser (Boehringer, Mannheim, Deutschland) kann dank dieses Farbstoffs die Bilirubinkonzentration bei 546 nm visualisiert werden.

4.4.2 Histologie

Bevor das Lebergewebe in der Dünnschnitt-Technik untersucht werden konnte, wurde es vor den Untersuchungen für paar Tage in einer phosphatgepufferten Formalinlösung fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Parafinblöcke eingebettet. Diese wurden anschließend 5 μm geschnitten und auf

Material und Methoden

Objektträgern fixiert, sowie mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Im Lichtmikroskop konnten die Schnitte auf die Ausprägung der Galleninfarkte als Zeichen der Leberschädigung beurteilt werden. Dabei handelt es sich um die cholestasetypischen pathognomonischen fokalen Nekrosen der Leber.

4.4.3 Molekularbiologische Untersuchungen des Lebergewebes (RT-PCR)

Das molekularbiologische Kombinationsverfahren aus Reverser Transkription (RT) und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Untersuchung der mRNA Expression der Transportproteine. Dafür wurden jeweils 30 mg des schockgefrorenen und bei -80 °C gelagerten Lebergewebes abgewogen, mittels eines Dismembrators homogenisiert und mit Hilfe von RNeasy Mini Kits (Quiagen, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die Qualität der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die entsprechenden Proben wurden dafür auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen und bei 80V 40 Minuten lang elektrophoretisch aufgetrennt. Die Umwandlung der RNA in die doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) erfolgte im nachfolgenden Schritt mittels reverser Transkription. Dafür wurden jeweils 2 µg RNA, Oligo(dT)18- Primer (Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), Superscript II RNaseH-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), dNTP's, 5 x first strand puffer und Dithiothreitol verwendet. Die reverse Transkription erfolgte nach dem folgenden Programm in einem Mastercycler. Zuerst wurde der Mastermix für 10 Minuten bei 72°C erhitzt und im nachfolgenden Schritt für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach der Effizienzbestimmung der verwendeten Primer (Tbl. 3) wurde die Expressionsanalyse der mRNA von Lhx2 und collagen1 α , mit dem Light Cycler System 1.5 (Roche, Mannheim, Deutschland) mittels der kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierungsmethode und dem kommerziell erhältlichen Farbstoff SYBR Green I derselben Firma durchgeführt. Durch die Bestimmung des Housekeeping-Gen GAPDH wurden alle Proben zusätzlich normalisiert.

Gen	Primer	Sequenz
Lhx2	vorwärts rückwärts	5'- GTCCAGGACCCGGGGCAGAT- 3' 5' - CGAGGCGTTGGACAGCTCCG - 3'

Material und Methoden

Collagen-1- α	vorwärts rückwärts	5' - GAAACCCGAGGTATGCTTGA – 3' 5' - GACCAGGAGGACCAGGAAGT – 3'
GAPDH	vorwärts rückwärts	5' - AACGACCCCTTCATTGAC – 3' 5' - TCCACGACATACTCAGCAC – 3'

Tabelle 3: Primersequenzen für die real time PCR.

Damit das Amplifizieren der genomischen DNA vermieden werden kann, wurden die Primer Intron-überspannend designt. Die Annealingtemperatur der beiden Primer-Paare (Target- und Housekeeping-Gen) lag bei 55°C. Dieses ermöglichte die Kombination beider Reaktionen im selben Lauf. Das Real Time PCR-Programm begann mit einem 10-minütigen Denaturierungsschritt, worauf 40-50 Amplifizierungszyklen folgten. Bei jedem PCR-Lauf wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Dafür wurden RNA von fünf gesunden unbehandelten Tieren und eine Probe ohne cDNA untersucht.

4.4.4 Western Blot

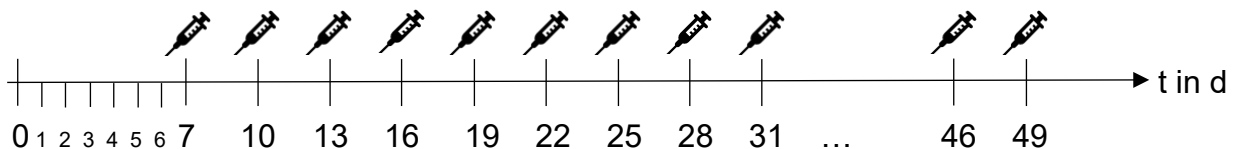
Für die Western Blot Proteinanalyse von Lhx2, NTCP (scl10a1), OATP2b1 (slco2b1), MRP2 (abcc2), BSEP (abcb11), MRP4 (abcc4), MRP5 (abcc5) und β -Aktin wurde das Lebergewebe im Lysepuffer homogenisiert (10 mmol/l Tris, pH 7,5, 10 mmol/l NaCl, 0,1 mmol/l Ethylenediaminetetraacetylsäure, 0,5% Triton X-100, 0,02% NaN_3 und 0,2 mmol/l Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid), 30 Minuten lang auf Eis inkubiert und schließlich bei 10000 x g 15 Minuten lang zentrifugiert. Vor der Verwendung des Lysepuffers wurde ein Proteininhibitorcocktail hinzugefügt (1:100 v/v: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Der Proteinüberstand wurde abpipettiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bicinchonininsäure-Proteinassays (Sigma-Aldrich) bestimmt, wobei bovines Serumalbumin als Standard diente. Je 40 μg Protein pro Spalte wurden diskontinuierlich auf dem SDS Polyacrylamidgel (12%) nach ihrem Molekulargewicht separiert und auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran transferiert (Immobilon-P; Millipore, Eschborn, Deutschland). Nach der Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert und für 60 Minuten mit einem peroxidasegebundenen Sekundärantikörper (1:2000, Cell Signaling Technology) inkubiert.

Material und Methoden

Die Proteinexpression wurde mittels der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz visualisiert (ECL plus, Amersham Pharmacia Biotech) und mit Hilfe des ChemiDoc™ XRS Systems (Quantity One, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) digitalisiert. Es erfolgte die densitometrische Auswertung (TotalLab, Nonlinear Dynamics, New Castle upon Tyne, Großbritannien), die Normalisierung auf das Beta-Actin-Signal als Ladungskontrolle (monoklonaler Maus-anti-beta-Aktin Antikörper, 1:20,000; Sigma-Aldrich), sowie die Angaben als relative Dichte.

4.4.5 Überlebensstudie

Um zu evaluieren, ob DPO α bei einer lang anhaltenden Leberschädigung in therapeutischer Gabe auch eine gewebsprotektive, antifibrotische Wirkung aufweist, wurden zusätzlich 30 Versuchstiere der Gallengangsligatur unterzogen und entsprechend dem unten abgebildeten Protokoll repetitiv alle 3 Tage ab dem 7. postoperativen Tag behandelt. Die Versuchstiere wurden täglich gesichtet, deren Zustand wurde entsprechend kontrolliert und notiert. Die Anzahl der verstorbenen Tiere wurde dokumentiert. Der Überlebensversuch endete 7 Wochen nach der Operation. Die verbliebenen Tiere wurden mittels intrakardialer Injektion einer Ketaminüberdosis getötet.



4.4.6 Statistik

Zur elektronischen Datenerfassung wurden die erhobenen Primärdaten in eine Microsoft-Excel-Tabelle eingegeben. Basierend auf den gesammelten Daten wurden mittels dem Softwarepaket SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA; USA) Säulendiagramme erstellt. Dargestellt wurden diese als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Die statistischen Analysen wurden mit der Software SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) berechnet. Die Prüfung auf die Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests durchgeführt.

Zum Vergleich zwischen der Kontroll- und der DPO-Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt wurde der Student's t-Test für die unverbundenen Stichproben verwendet.

Material und Methoden

Falls die Voraussetzungen für diese Tests nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test für die unverbundenen Stichproben (Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Zum multiplen Vergleich wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom entsprechenden post-hoc-Test, durchgeführt. Zur statistischen Auswertung des Überlebensversuchs erfolgte die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse, gefolgt vom log-rank-Test. Statistisch signifikant wurden die Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) angesehen.

Ergebnisse

5 Ergebnisse

5.1 Parameter der biliären Fibrose

Als einer der systemischen Cholestasemarker dient das Abbauprodukt von Häm, das Bilirubin, das über bestimmte Transportersysteme aus dem Blut in die Leber aufgenommen, konjugiert und später wieder ausgeschieden wird. Bei Leberschädigung kumuliert das Bilirubin im Blut. Erwartungsgemäß steigt die Konzentration von Bilirubin in der Kontrollgruppe deutlich an (Tbl. 4). Im eigenen Arbeitskreis konnte der eindeutige protektive Effekt von DPO α bei akuter Leberschädigung nach 14 Tagen nicht gezeigt werden, weswegen der Beobachtungszeitraum auf 28 Tage in dieser Arbeit verlängert wurde [Sigal et al. 2010]. Nach einem längeren Beobachtungszeitraum konnte die Hypothese über den positiven protektiven Effekt von DPO α in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Konzentration von Bilirubin in der DPO-Gruppe fiel im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich niedriger aus (Tbl. 4). Die therapeutische Gabe von DPO α kann demzufolge bei akuter Leberfibrose diese zwar nicht aufhalten, jedoch verlangsamen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe traten die Galleninfarkte als Zeichen der Gewebsnekrose etwas seltener auf (Tbl. 4).

Die während der Leberfibrose durch Zytokine aktivierten Ito-Zellen wandeln sich in Myofibroblasten um. Derart verändert produzieren sie in hohem Maße extrazelluläre Matrixbestandteile, insbesondere Kollagen 1 α . Die leicht verringerte Expression von Kollagen 1 α in der mit DPO-behandelten Gruppe bestärkt somit die oben beschriebene Aussage über die gewebsschutzende Wirkung von DPO α bei akuter Leberschädigung.

	Sham	28 Tage nach BDL	
		Kontrolle	DPO
Bilirubin (mmol/l)	11 \pm 0	371 \pm 44	302 \pm 41
Galleninfarkte (%)	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1
mRNA Kollagen-(I)- α 1/GAPDH (rel. Dichte)	0.15 \pm 0.03	6.09 \pm 2.0	3.88 \pm 0.66

Tabelle 4: Konzentration von Bilirubin in Plasma, histologisch gesicherte Galleninfarkte sowie die mRNA Expression von Kollagen-(I)- α in Sham-operierten Tieren ($n = 3 - 4$) und Tieren am Tag 28 nach

Ergebnisse

BDL und Gabe von DPO α (DPO) oder 0,9% NaCl (Kontrolle). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

5.2 Expression der Transportproteine

Hepatobiliäre Transportproteine sind auf der basolateralen und der kanalikulären Membran des Hepatozyten lokalisiert und dienen einem gerichteten aktiven Gallensäuretransport aus dem sinusoidalen Blut in den Gallengang [Gartung et al. 1996, Keppler et al. 2011]. Als Konsequenz einer eingeschränkten Gallesekretion entwickelt die Leber eine Reihe von adaptiven Mechanismen, um die schädlichen Effekte der toxischen Galleinhaltsstoffe zu minimieren. Dazu gehören auch die Veränderungen in der Expression sowohl basolateraler als auch kanalikulärer Transportergene. Neben dem veränderten Expressionsmuster spielen auch transkriptionale Veränderungen, wie beispielsweise direkte Inhibition der Transportproteinaktivität oder Lokalisationsveränderungen eine entscheidende Rolle [Roma et al. 2008].

Die Expression der Transportproteine während der akuten Leberschädigung wurde mittels Western Blot untersucht.

5.2.1 Influx über die basolaterale Membran

Die quantitativ wichtigsten Aufnahme-Transportproteine auf der basolateralen Membran sind der NTCP und die Gruppe der OATPs [Keppler et al. 2011]. Verglichen mit der Sham-Gruppe fällt die Expression von NTCP bei den mit NaCl-behandelten Tieren am zweiten postoperativen Tag auf 60% ab, während diese bei den mit DPO-behandelten Tieren eine deutliche Steigerung aufweist und nach 14 Tagen erneut leicht ansteigt. Insgesamt hält sich die Expression von NTCP in der DPO-behandelten Gruppe nach der anfänglichen Steigerung im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich länger stabil. Nach 28 Tagen fällt die NTCP-Expression jedoch unabhängig von der Behandlung in beiden Gruppen auf weniger als 30% ab (Abb. 3).

Die Expression von OATP2b1 sinkt während der extrahepatischen Cholestase im Vergleich zu der Sham-Gruppe am 2. Tag nach BDL auf ca. 50 %. Dieser Abfall wird von der DPO-Behandlung nicht beeinflusst. Die Konzentration dieses Transportproteins liegt nach 28 Tagen weiterhin unabhängig von der Behandlung um die 50% (Abb. 3).

Ergebnisse

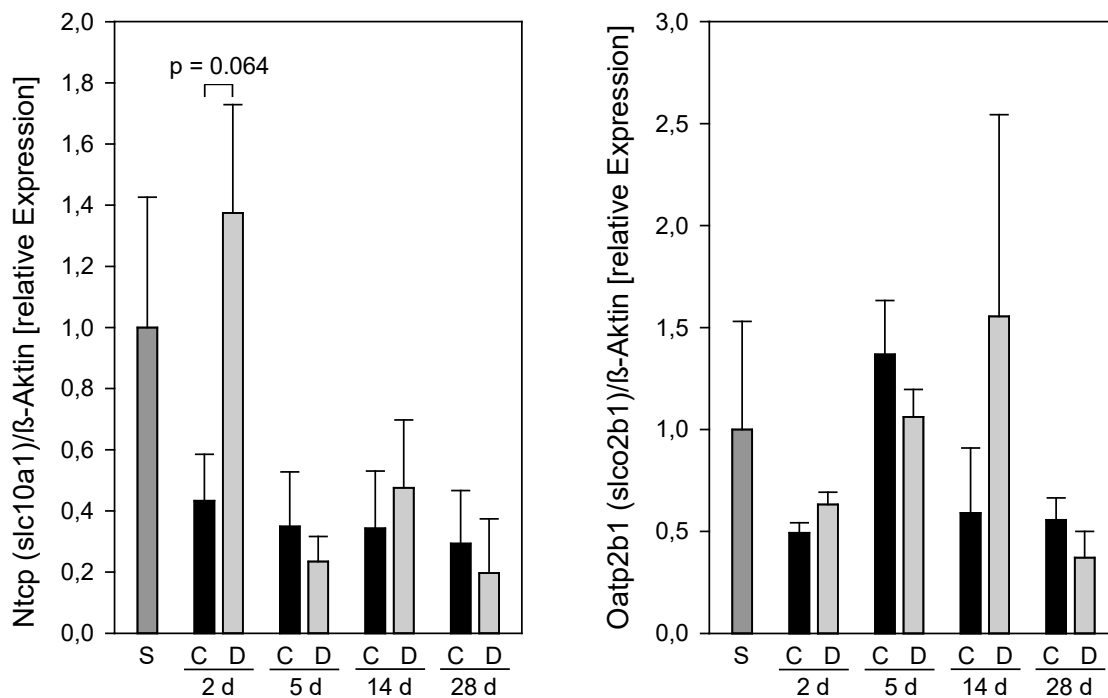


Abbildung 3: Relative Expression der basolateralen Transportproteine NTCP (*links*) sowie OATP2b1 (*rechts*) der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach BDL und Gabe von DPO α (**D**; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (**C**; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (**S**; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

5.2.2 Efflux über die kanalikuläre Membran

Sowohl das MRP2- als auch das BSEP-Transportprotein tragen dazu bei, die Galle durch die kanalikuläre Membran in die Gallengänge zu befördern. Dies erfolgt sowohl über die energieabhängige als auch über die energieunabhängige Transportproteine [Keppler 2011]. Die Expression von MRP2-Transportprotein fiel aufgrund der Cholestase in allen Gruppen bis auf schließlich 50% nach der Gallengangsligatur am Tag 28 ab. Dieser Rückgang blieb trotz der DPO-Behandlung der Tiere unverändert und wurde von der Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 4).

Die Expression von BSEP weist dagegen in der Kontrollgruppe eine besondere Veränderung auf. BSEP fällt nach 14 Tagen postoperativ bis auf 60 % ab, steigt jedoch wieder auf das 2-3-fache im Vergleich zu der Sham-Gruppe am Tag 28 an. Im Vergleich zu der NaCl-behandelten Gruppe zeigt der Kurvenverlauf der DPO-Gruppe ein ähnliches Ergebnis, der Anstieg erfolgt jedoch schon früher und ist deutlich ausgeprägter (Abb. 4).

Ergebnisse

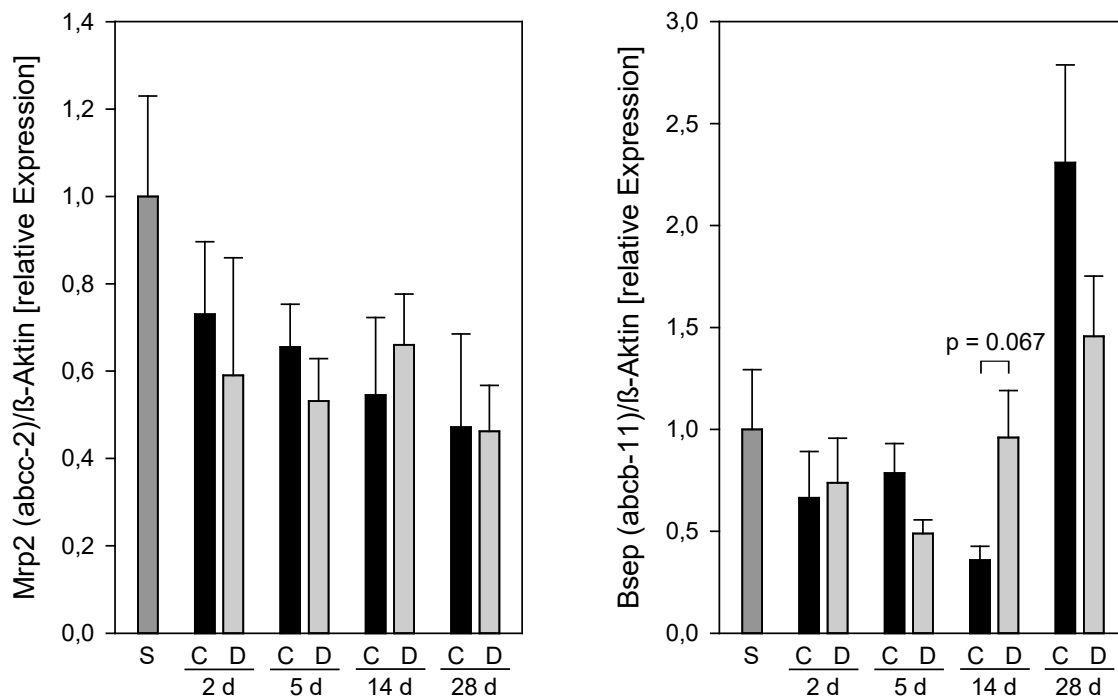


Abbildung 4: Relative Expression der apikalen Transportproteine MRP2 (rechts) und BSEP (links) der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach BDL und Gabe von DPO α (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (C; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

5.2.3 Retrograder Efflux über die basolaterale Membran

MRP4 und MRP5 sind einseitig gerichtete Transportproteine, die organische Anionen in das sinusoidale Blut insbesondere dann transportieren, wenn die Aktivität von kanalikulären Efflux-Transportproteinen beeinträchtigt ist [Barnes et al. 2007, Keppler 2011, Roma et al. 2008]. Die neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse suggerieren, dass MRP4 dabei den wichtigsten Repräsentanten der hepatischen basolateralen Transportproteine während der obstruktiven Cholestase im murinen Modell darstellt [Chai et al. 2011, Mennone et al. 2006]. Die Expression von MRP4 blieb jedoch am 2. und am 5. Tag nach der BDL in der NaCl-behandelten Gruppe unverändert, während die Konzentration am Tag 14 bis auf 35% abgefallen ist, um am Tag 28 wieder auf über 120% anzusteigen. In der DPO-behandelten Gruppe blieb die Konzentration länger nahezu unverändert bis zum 14. postoperativen Tag.

Die Rolle von MRP5 ist während des Gallensäuretransports derzeit noch nicht genau erforscht. Es wird vermutet, dass MRP5 als Alternativtransporter zur Eliminierung der Gallensäuren während der Cholestase dient [Barnes et al. 2007,

Ergebnisse

Zollner et al. 2006]. Die Expression von MRP5 während der obstruktiven Cholestase fiel zu jedem Untersuchungspunkt in beiden Gruppen bis auf über 40% ab. Es konnte kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen gezeigt werden.

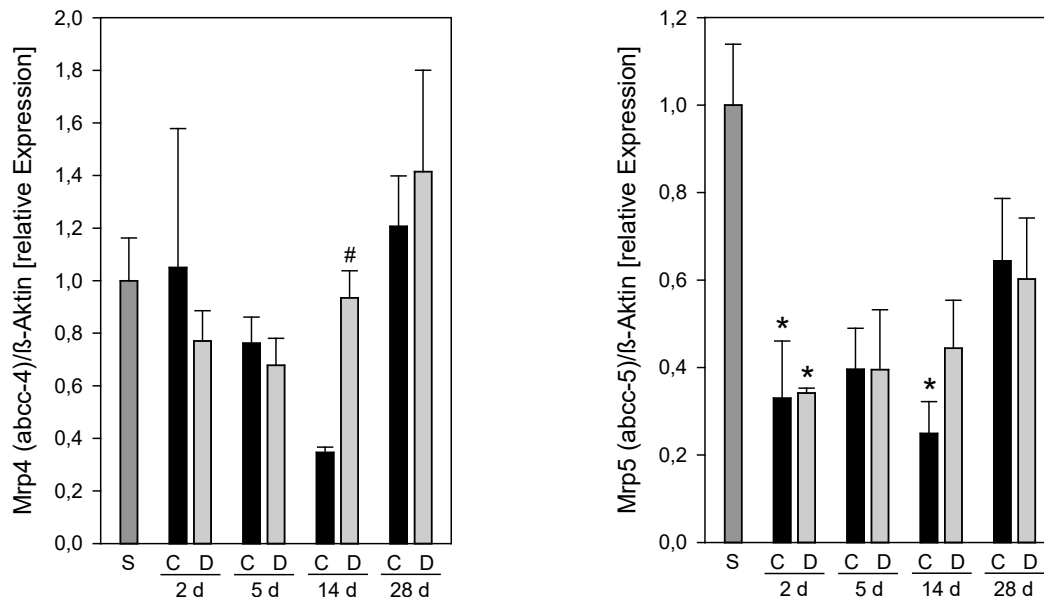


Abbildung 5: Relative Expression der basolateralen Transportproteine MRP4 (*links*) und MRP5 (*rechts*) der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach BDL und Gabe von DPO α (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (C; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; * $p < 0,05$ vs. Sham (S), # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

5.3 Expression von Lhx2 als Zeichen für die Aktivierung der Ito-Zellen und der Kollagenumverteilung nach BDL

Bei der Leberfibrose kommt es aufgrund der länger anhaltenden Gewebeschädigung zur einer Dysregulation des komplexen Wundheilungsprozesses und damit zur Überproduktion der extrazellulären Matrix (EZM) [Friedmann 2008, Wandzioch 2004]. Die aktivierten hepatischen Sternzellen (HSC) stellen dabei die Hauptlieferanten für die extrazelluläre Kollagenproduktion dar. Die vermehrte Aktivierung der Ito-Zellen und die damit verbundene progressive vermehrte Ablagerung von extrazellulären Matrixbestandteilen spiegelt das Fortschreiten der Fibrose wider.

Kontrolliert und inhibiert wird die Aktivierung der Ito-Zellen über unterschiedliche Genen und Kettenreaktionen. Einer der wichtigsten inhibitorischen Transkriptionsfaktoren der aktivierten Ito-Zellen ist der LIM-homebox-Gen Lhx2. Dieses in adulten Ito-Zellen nachgewiesene Protein bewahrt die Ito-Zellen im

Ergebnisse

Ruhezustand [Friedman 2008]. Lhx2 zeigt damit indirekt proportional auch das Fortschreiten der Fibrose. Die Überexpression von Lhx2 in den kultivierten HSC führt zur verminderten Zellaktivierung [Friedman 2008, Wandzioch 2004]. In der aktuell vorliegenden Studie ist die mRNA Expression von Lhx2 in der Kontrollgruppe (Abb. 6 links) während der Cholestase am zweiten postoperativen Tag deutlich hoch reguliert und sinkt im Verlauf wieder bis fast auf das Ausgangsniveau ab. Die mRNA Expression von Lhx2 in der DPO-behandelten Gruppe bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum auf dem stabilen Niveau (Abb. 6 links).

Die Expression von Lhx2-Protein zeigt in der vorliegenden Studie deutlichere Veränderungen als Lhx2-mRNA. Am 5. postoperativen Tag erfährt die Expression von Lhx2-Protein in der Kontrollgruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe eine signifikante Steigerung. Sie erreicht das 2 fache der Sham-Gruppe, sinkt am 14. postoperativen Tag kurz ab, um am Tag 28 das Niveau des 5. postoperativen Tages wieder zu erreichen (Abb. 6 rechts). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigt die Lhx2-Protein Expression in der DPO-behandelten Gruppe einen deutlich früheren signifikanten Anstieg zu der Sham-Gruppe, nämlich schon am 2. postoperativen Tag. Ähnlich wie in der Kontrollgruppe erfährt die Expression am 5. und 14. postoperativen Tagen eine Absenkung, um zum Tag 28 nach der Gallengangsligatur auf das doppelte wieder zu steigen (Abb. 6 rechts). Insgesamt ist bei beiden Gruppen am Tag 28 eine signifikante Steigerung der Expression von Lhx2-Protein unabhängig von der Behandlung bis auf 2 fache im Vergleich zu der Sham-Gruppe zu verzeichnen (Abb. 6 rechts).

Aus der vorangegangenen Studie der eigenen Arbeitsgruppe [Sigal et al. 2010] ist die anti-fibrotische Wirkung von DPO α bei der akuten Leberschädigung bekannt. Anhand der aktuellen Ergebnisse scheint diese anti-fibrotische Wirkung über die Regulation des Lhx2-Gens zu erfolgen. In der frühen Phase der Fibrose bei akuter Schädigung wird das Lhx2 von DPO α beeinflusst. Der signifikante Anstieg in der Expression von Lhx2-Protein am 2. postoperativen Tag bekräftigt die Hypothese, dass der anti-fibrotische Effekt von DPO α auf der Regulation des Lhx2-Transkriptionsgens basiert. Als Zeichen der verminderten Ito-Zellaktivierung und damit des verminderten Fortschreitens der Leberfibrose steigt die Expression von Lhx2-Protein in der DPO-behandelten Gruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe am 2. postoperativen Tag an. Dieser Effekt verliert sich im weiteren Verlauf bei der Chronifizierung der Fibrose und ist am Tag 28 nicht mehr nachweisbar. Die Expression von Lhx2-Protein ist in beiden Gruppen auf dem ähnlich hohen Niveau. Ob es sich dabei um eine passive protektive

Ergebnisse

Antwort der Zelle auf die Schädigung als Schutzmechanismus handelt, wird in dieser Studie nicht geklärt.

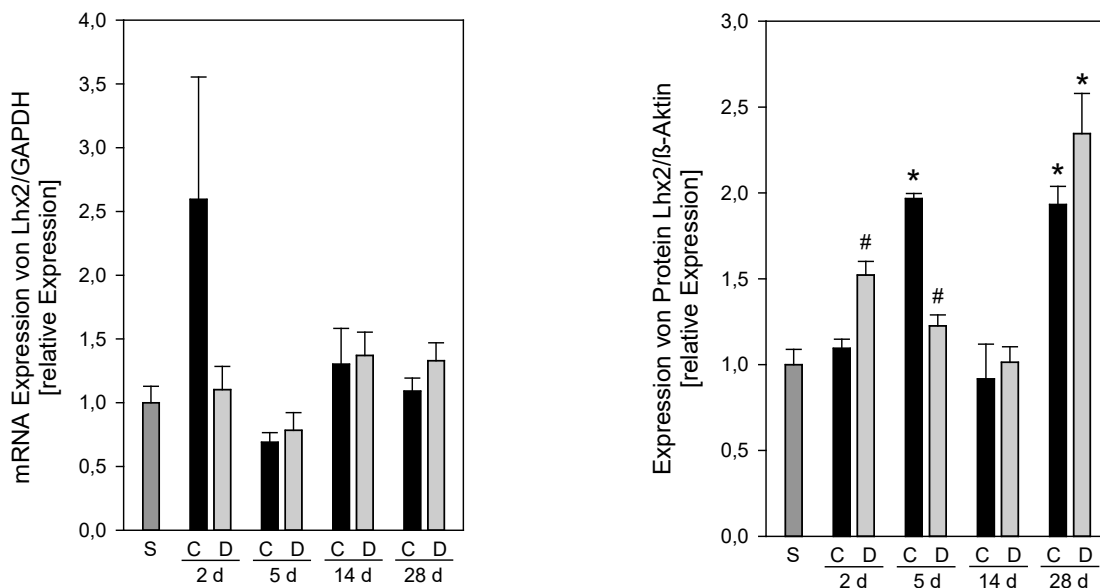


Abbildung 6: Relative Expression der mRNA (links) und des Proteins (rechts) von Lhx2 der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (C; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; * $p < 0,05$ vs. Sham (S), # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

5.4 Überlebensstudie

Die Erkenntnis über die gewebsschutzende Wirkung von DPO α bei akuter Leberfibrose konnte bereits in der eigenen Arbeitsgruppe [Sigal et al. 2010] gezeigt werden. Von großem klinischem Interesse ist jedoch die Wirkung von DPO α bei chronischer Leberschädigung. Um den möglichen positiven therapeutischen Effekt des DPO α bei chronischer Leberfibrose zu überprüfen, wurden Überlebensversuche nach dem oben beschriebenen Modell durchgeführt. Anhand der wissenschaftlichen Erkenntnisse am murinen Modell über die maximale Ausprägung der Leberinfarkte als Zeichen des chronischen Leberschadens und Höhepunkt der Fibrose zwischen dem 5. und 10. postoperativen Tag wurde als Zeitpunkt für den Behandlungsbeginn der 7. postoperative Tag gewählt, um das chronische Geschehen besser zu simulieren [Georgiev et al. 2008]. Es wurde entsprechend dem experimentellen Protokoll den Versuchstieren entweder 0,9%-ige NaCl versus DPO α appliziert. Das 49-Tage-Überleben wurde dokumentiert (Abb. 7)

Ergebnisse

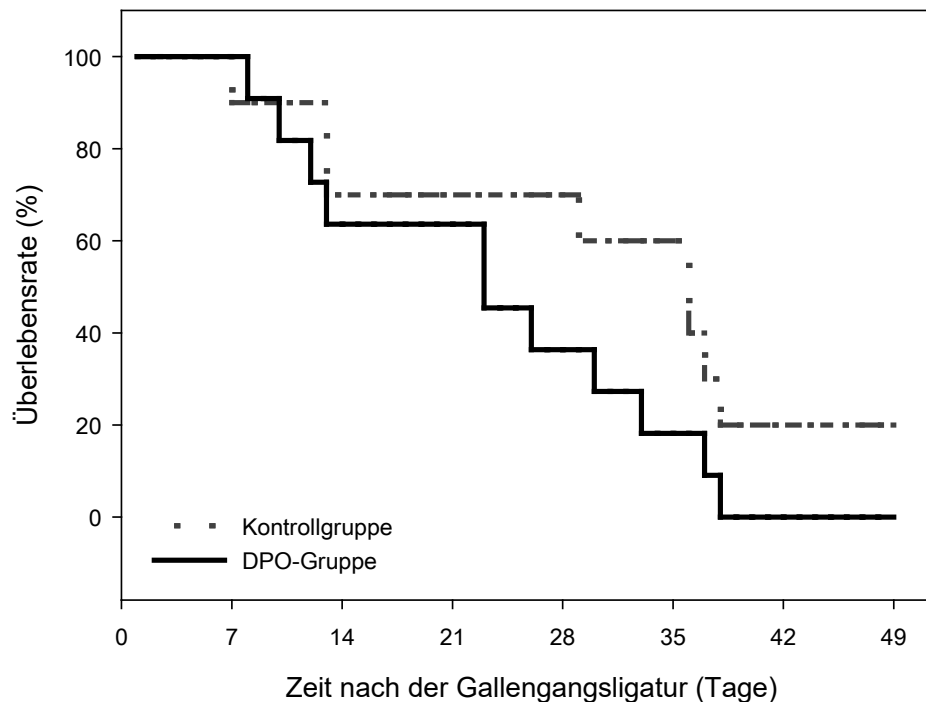


Abbildung 7: Kaplan-Maier-Überlebenskurve der Mäuse nach BDL. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Kontrollgruppe (NaCl), die durchgezogene Linie steht für die DPO-Gruppe. Der Log-rank Test ergab keinen signifikanten Unterschied $p > 0,05$.

Wie in der Abbildung 7 dargestellt, verlaufen die Überlebenskurven der beiden Gruppen 48 Stunden nach Beginn der Behandlung und damit ab dem 9. postoperativen Tag versetzt auseinander. In der Kontrollgruppe ist die Letalität bis zum 29. – 35. postoperativen Tag weniger ausgeprägt als in der DPO-behandelten Gruppe. Während in der Kontrollgruppe am Tag 35 die Überlebensrate noch bei 60% lag, betrug diese bei mit DPO-behandelten Tieren lediglich 20%. Das Überleben der Tiere scheint damit durch die Behandlung mit dem DPO α eher negativ beeinflusst zu werden. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Somit lässt sich kein Überlebensvorteil bei Behandlung der Tiere mit dem DPO α ab dem 7. postoperativen Tag beobachten.

Diskussion

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 Mausmodell

Standardisierte Tierversuche sind unverzichtbar zur Untersuchung verschiedener Aspekte zahlreicher Erkrankungen sowie für die präklinische Testung neuer Therapieansätze. Sie stellen eine wichtige Verbindung zwischen molekular- und zellbiologischen Untersuchungen sowie klinischen Studien dar [Menger et al. 1999, Wu et al. 2006]. Tierversuche weisen im Vergleich zu Untersuchungen an humanen Gewebeproben aus Leberbiopsien bzw. Organentnahmen [Allam et al. 2015, Tao et al. 2015] oder an Zellkulturen [Jia et al. 1998] einen enormen Vorteil auf. Sie ermöglichen fortlaufende Gewebentnahme, um die komplexen dynamischen Prozesse wie bei fibrotischen Lebererkrankungen sowie Interaktionen zu analysieren [Constantinou et al. 2005, Iredale et al. 2007].

Nagetiere gehören in der experimentellen Leberchirurgie zu den meist verwendeten Versuchstieren [Fausto & Riehe 2005]. Die Vorteile liegen vorwiegend im ökonomischen Bereich, d.h. in der Anschaffung und Haltung der Tiere. Ein weiterer Nutzen liegt in der Lebenszeit der Tiere. Die Fibrosierung im experimentellen Mausmodell lässt sich schon nach wenigen Tagen nachweisen [Georgiev et al. 2008], während fibrotische Parenchymveränderungen im humanen Gewebe je nach Schädigung erst Monate bis Jahre später nachweisbar sind.

6.1.2 Modell der Gallengangsligatur

Die ersten Fibrosierungsmodelle wurden hauptsächlich für Ratten entwickelt und erst später auf das Mausmodell übertragen [Starkel & Leclercq 2011]. Die Pathomechanismen der Leberfibrose lassen sich gut von der Maus auf den Menschen übertragen, da das Maus-Genom in über 95% mit dem humanen übereinstimmt [Walkin et al. 2013]. Das am häufigsten angewendete und etablierte Modell der extrahepatischen cholestatischen Leberschädigung stellt die Gallengangsligatur dar [Kountouras et al. 1984]. Dabei wird mikrochirurgisch nach der Laparotomie der Gallengang freipräpariert und mit Hilfe von drei Ligaturen durchtrennt. Der dadurch entstehende Gallensäureaufstau führt über die Inflammation zur Ausbildung einer Fibrose [Georgiev et al. 2008]. Diese lässt sich gut und rasch reproduzieren [Liedtke et al. 2013] bzw. standardisieren. Das Modell erfordert aber gleichzeitig aufgrund der Mausgröße gute manuelle Fertigkeiten des Operateurs.

Diskussion

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Regulation der hepatobiliären Transportproteine bei akuter Cholestase

Der Rückstau so genannter gallepflichtiger Substanzen in das Blut ist das Resultat der Dysbalance zwischen Galleproduktion und -sekretion während der Cholestase. Zusätzlich geht damit ein Mangel funktionell wichtiger Gallebestandteile im Darm einher [Gatzen & Pausch 2002, Geier et al. 2003, Kredel et al. 2008]. Die Persistenz der gewebstoxischen Gallebestandteile führt über die Hyper- und Nekroinflammation zu einem ungehinderten Fortschreiten der Fibrosierungsprozesse. Um dieser Schädigung entgegenzuwirken, verfügt der Hepatozyt über gewisse Anpassungsmechanismen durch die hepatobiliären Transportproteine [Keppler 2011, Roma et al. 2008]. Ob es sich dabei um eine aktive protektive Reaktion des Hepatozyten handelt, indem das Ausmaß der Schädigung durch den Aufstau von Gallensäuren sowie anderen potentiell toxischen Substanzen minimiert wird, oder um eine ineffektive passive Folgeantwort, ist noch ungeklärt. Daher lag das Hauptaugenmerk der hier vorgestellten Studie auf der Regulation der ausgewählten hepatobiliären Transportproteine während der extrahepatischen Cholestase.

6.2.1.1 Regulation der basolateralen Transportproteine

Die Aufnahme von Gallensäuren und organischen Anionen aus dem Portalblut in den Hepatozyten über die basolaterale Membran erfolgt gegen den Konzentrationsgradienten durch das Natrium-abhängige (NTCP) oder Natrium-unabhängige Transportsystem (OATP Familie) [Kullak-Ublick et al. 1997 und 2000]. Als Antwort auf die akute Schädigung während der extrahepatischen Cholestase wird die Aufnahme der gallepflichtigen Bestandteile in den Hepatozyt gedrosselt. Die Expression des Natriums-abhängigen Transportproteins NTCP fällt dadurch ab. In zahlreichen Studien konnte am Modell der Gallengangsligatur gezeigt werden, dass sich die Expression von NTCP bis zu 7 Tagen nach der Schädigung reduziert [Gartung et al. 1996, Mennone et al. 2006, Zollner et al. 2002]. Dieser Abfall scheint dabei von der Ursache der Cholestase unabhängig zu sein, wie die Arbeitsgruppe von Cheng et al. in deren Übersichtsarbeit verdeutlicht hat [Cheng et al. 2007]. Die vorliegenden Ergebnisse dieser experimentellen Studie bestätigen den protektiven Effekt der verminderten NTCP-Expression. Wie erwartet, fällt die mRNA-Expression von NTCP schon 24 h nach der Gallengangsligatur ab. Im Vergleich zu der Sham-Gruppe geht die Expression von NTCP bis zum 14. postoperativen Tag auf 1/3 zurück und erholt

Diskussion

sich bis zum 28. Tag nach der BDL nicht. Aus der Literatur geht des Weiteren hervor, dass die Inhibition der NTCP-Expression einen möglichen Stimulus für die Aktivierung eines der wichtigsten Genregulatoren im hepatobiliären Kreislauf, den FRX (farnesoid X receptor), darstellt [Slijepcevic et al. 2017]. Der nukleäre Rezeptor und Transkriptionsfaktor FXR wird als Heterodimer mit dem Retinoidrezeptor X (RXR α , NR2B1) aktiv [Geier et al. 2004, Karpen et al. 2002]. Er greift in den Metabolismus der Gallensäureproduktion, in den Glucose- und Fettstoffwechsel sowie in die Inflammation ein [Lefebvre et al. 2009].

Ein weiterer wichtiger Vertreter der Transportproteine auf der basolateralen Seite ist die Gruppe der Natrium-unabhängigen Transportproteinfamilie OATP (solute carrier organic transporter family). Die wichtigsten humanen Vertreter dieser Familie (1A2, 1B1, 1B3, 2B1) sind für die Beförderung von hauptsächlich unkonjugierten Gallensäuren zuständig und zählen zu den sekundär aktiven Transportsystemen [Nicolaou et al. 2012]. Es sind multispezifische Transporter mit divergierenden, teilweise jedoch überlappenden Substratspektren [Geier et al. 2004, Kullak-Ubrich et al. 2001]. Es ist aus der Literatur bekannt, dass während der obstruktiven Cholestase die Expression von OATP-Transportern (1a4, 1b2) im Rattenmodell entweder unverändert bleibt [Geier et al. 2007] oder leicht reduziert wird [Brcakova et al 2009]. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die eingeschränkte Substratspezifität der OATP-1-Subgruppe im Vergleich zu den anderen Vertretern der OATP-Familie dar [Kullak-Ubrich et al. 2001]. Der OATP2B1-Vertreter gehört zusammen mit OATP1B1 und OATP1B3 zu den leberspezifischen Transportern, wenn auch laut den neuesten Studien eher in geringerem Ausmaß [Thakkar et al. 2017]. Das Substratspektrum dieses Transportproteins ist breit und es wird suggeriert, dass seine Rolle bei der Elimination von zahlreichen Endo- und Xenobiotics enorm sei [Hagebuch & Gui 2008]. In diesem Zusammenhang scheint die Regulation des OATPs eine protektive Wirkung zu haben. Dieses wird dadurch bestätigt, dass ein leichter Abfall der Expression 24 h nach der Gallengangsligatur zu beobachten ist.

Die genauere Funktion und Bedeutung von MRP4 sind schlecht erforscht. Es wird spekuliert, dass MRP4 aufgrund seiner gewebsschutzlichen Wirkung wie bei der obstruktiven Cholestase zu den wichtigsten hepatobiliären Transportproteinen auf der basolateralen Seite gehört [Chai et al. 2011, Mennone et al. 2006]. Aufgrund seines breiten Substratspektrums, zu dem interessanterweise auch endogene Zellkomponenten, wie zyklische Nukleotide und Nukleotidanaloga gehören, ist MRP4

Diskussion

in diverse Signal- und Transkriptionswege eingebunden. Daher scheint MRP4 ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zur Regulation unterschiedlicher pathophysiologischer Prozesse zu sein [Borst et al. 2007, Russel et al. 2008]. Die gesteigerte Expression des hepatischen MRP4-Transportproteins wirkt durch die vermehrte Gallensäureausscheidung der intrazellulären Gallensäuretoxizität entgegen [Chai et al. 2011]. In diesem Zusammenhang kann das MRP4-Transportprotein als so genanntes „back up“-System angesehen werden, das durch den Transport der Gallensäuren aus der Leber heraus in das Blut eine protektive Aufgabe besitzt [Klaasen et al. 2007]. Die in der vorliegenden Studie gezeigte leichte Tendenz zur gesteigerten Expression bestärkt diese Aussage. Nach vier Wochen wurde eine diskrete Steigerung der Expression des MRP4 aufgezeichnet.

Es ist bekannt, dass MRP5 auf der basolateralen Hepatozytenmembran lokalisiert ist und womöglich in der Leber exprimiert wird [Zollner et al. 2006]. Die vermehrte MRP5-Expression wurde bei Patienten mit primär biliärer Leberzirrhose dokumentiert [Barner et al. 2007]. Erstaunlicherweise zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen deutlichen Abfall der MRP5-Expression bei einer obstruktiven Schädigung.

6.2.1.2 Regulation der kanalikulären Transportproteine

Der ATP-abhängige Transport der Gallebestandteile über die kanalikuläre Membran in die Galle wird vorwiegend durch die Konjugatexportpumpe MRP2 sowie die Gallensalzexportpumpe BSEP gewährleistet [Keppler et al. 2011]. Das MRP2-Transportprotein ist vor allem für die Ausscheidung von organischen Anionen und konjugiertem Bilirubin verantwortlich. Das Fehlen von funktionstüchtigen MRP2-Transporter führt zur Ausbildung der so genannten konjugierten Hyperbilirubinämie [Nies & Keppler 2007]. Gewöhnlich wird dieses Defizit vorerst über die Überexpression anderer Transportproteine kompensiert [Nies & Keppler 2007]. Reicht dieser Schutzmechanismus nicht aus, kommt es zur Ausbildung der Fibrose. Am Rattenmodell der obstruktiven Cholestase konnte gezeigt werden, dass die Expression von MRP2 zu allen Zeiten der Fibrosierung unabhängig vom Cholestasemodell erheblich abfällt [Brcakova et al 2009, Hyogo et al. 2001, Kanno et al. 2003, Paulusma et al. 2000, Trauner et al. 1997, Donner et al. 2007]. Die Regulation des MRP2-Transportproteins am Mausmodell wird in der wissenschaftlichen Literatur dagegen widersprüchlich beschrieben. Die Ergebnisse reichen von der starken Verminderung der Expression um den 7. Tag bei den FVB/129 Mäusen, über die Stagnierung zum

Diskussion

selben Zeitpunkt bei 129/Sv und C57/BL6 Mäusen [Mennone et al. 2010], bis zu der Überexpression bei C57/BL6 Mäusen [Slitt et al. 2007, Lichteig et al. 2007]. Die Forschungsgruppe von Wagner et al. beschreibt ähnliche Ergebnisse bei C57/BL6 Mäusen nach der Gallengangsligatur wie Mennone et al. (2010). Die MRP2-Proteinexpression bleibt am Tag 1, 3 und 7 erhalten [Wagner et al. 2003]. Die vorliegenden Ergebnisse dieser experimentellen Studie bekräftigen diese Aussage, da ein deutlicher Rückgang der MRP2-mRNA in beiden Gruppen unabhängig von der Behandlung zu verzeichnen war. Die Expression von MRP2 fiel am 2. postoperativen Tag nach der Gallengangsligatur bei den mit DPO-behandelten Mäusen im Vergleich zu der Sham-Gruppe auf 70% und auf die Hälfte am Tag 28 p.o. ab.

Das zweitwichtigste Transportprotein auf der kanalikulären Seite ist der Vertreter der ABC-Familie, der BSEP. Die molekulare Struktur von BSEP im murinen Modell ist mit dem humanen Vertreter fast identisch. BSEP ist vorwiegend für die Ausscheidung von unkonjugierten monovalenten Gallensäuren zuständig. Die Mutation am BSEP-Transportergen führt zur mangelnden bzw. fehlender Expression dieses Transportproteins und damit zur intrahepatischen Cholestase [Nicolaou et al. 2012]. Im humanen Modell entsteht folglich die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 [Kosters & Karpen 2008]. Im Gegensatz zum humanen Modell entwickeln die Mäuse beim Fehlen von BSEP nur eine milde, nicht progressive, dennoch persistierende intrahepatische Cholestase [Kosters & Karpen 2008]. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von BSEP während der obstruktiven Cholestase bis zum 7. Tag nach der Schädigung unverändert bleibt oder herabgesetzt ist [Donner et al. 2007, Mennone et al. 2010, Wagner et al. 2003]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir die Erkenntnisse aus der Literatur bestätigen. Darüber hinaus konnten wir demonstrieren, dass die Expression von BSEP 2 Wochen nach der Gallengangsligatur auf 40% abfällt, um anschließend nach 4 Wochen sich wieder zu verdoppeln. Es sind daher weitere Untersuchungen nicht nur am akuten, sondern auch am chronischen Cholestasemodell erforderlich, um die Prozesse in der Regulation der Transportproteine genauer verstehen und erklären zu können.

6.2.2 Der Einfluss von Darbepoetin alpha auf die Regulation der Transportproteine

Wie bereits in zahlreichen Studien demonstriert, wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit der gewebsschützende Effekt von EPO und seiner Analoga auf die akute Leberschädigung belegt. Aufgrund der anti-inflammatorischen, anti-fibrotischen

Diskussion

und anti-apoptotischen Eigenschaften stagniert das Fibrosierungsprozess bei den mit DPO-behandelten Tieren. Anhand der Veränderungen am Expressionsmuster zahlreicher Gallensäuretransporter, wie bereits im Kapitel Ergebnisse dargestellt, ist anzunehmen, dass DPO α einen indirekten Einfluss auf die Regulation der Transportproteine hat, denn eine direkte protektive Wirkung von DPO α auf den Hepatozyten konnte bisher nicht belegt werden. Die aktuelle Studie gibt Hinweise darauf, dass die Behandlung mit DPO α zur Aufrechterhaltung der Transportproteine auf einem stabilen Niveau führt. Belegen können wir diese Aussage dadurch, dass die NTCP-Expression in der Kontrollgruppe nach der Gallengangligatur 48 h p.o. auf 40% abfiel, während bei der DPO-behandelten Gruppe dieser Abfall erst 5 Tage nach der Operation auftrat. Ein ähnlicher Verlauf ist bei der Regulation des Transportproteins MRP4 zu beobachten. Während der obstruktiven Cholestase ist die Expression von MRP4 in der Kontrollgruppe stetig gefallen, während die mit DPO-behandelten Tieren eine deutlich steigende Tendenz ab dem 14. p.o. Tag aufzuweisen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die protektive Wirkung von DPO α über die Regulation der hepatobiliären Transportproteine und deren Genexpression erfolgt.

Aus den wissenschaftlichen Studien ist bekannt, dass EPO durch die Interaktion mit dem Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) als heterodimerer Komplex neben der Hämatopoese in zahlreiche Regulationsmechanismen eingreift. Es stellt aufgrund seines anti-nekrotischen, anti-apoptotischen und anti-inflammatorischen Potentials ein vielversprechendes Target in der Entwicklung neuer Therapieansätze dar [Joyeux-Faure et al. 2007, Sigal et al. 2010].

Die Akkumulation von Gallensäuren während der obstruktiven Cholestase führt zur systemischen Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-1 β und Interleukin-6, welche durch die Aktivierung von NF-kappaB verursacht wird [Lui et al. 2001, Plebani et al. 1999]. Pro-inflammatorische Zytokine sind potentielle Inhibitoren der Transportprotein-Expression [Roma et al. 2008]. In der humanen Leber von Patienten mit inflammationsbedingter Cholestase ist die Expression von NTCP, OATP2 und BSEP herabgesetzt [Zollner et al. 2001]. Wissenschaftliche Studien beschreiben die verminderte Expression von NTCP-mRNA und deren Aktivität nach der Behandlung mit IL-1 β [Li et al. 2002], während die Behandlung mit IL-6 und TNF- α die Expression von NTCP in der mit Sepsis assoziierten Cholestase unverändert lassen [Sturm et al. 2005].

Diskussion

EPO wird als potentiell anti-inflammatorischer Immunmodulator von NF κ B beschrieben [Nairz et al. 2011], der die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen beeinflusst [Ben-Ari et al. 2011, Le Minh et al. 2007, Nairz et al. 2012]. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits die anti-inflammatorische Wirkung von DPO während der BDL gezeigt werden. In diesem Zusammenhang war die Infiltration der Makrophagen in die Leber erheblich reduziert und die Perpetuation der nekro-inflammatorischen Reaktion deutlich inhibiert [Sigal et al 2010]. Die in der aktuellen Studie vorliegenden Ergebnisse der verzögerten Expressionsreduktion von NTCP und MRP4 könnten folglich das Ergebnis der Nekroinflammation als eine Reaktion auf DPO darstellen.

Die Verzögerung der Nekroinflammation sowie der Makrophageninfiltration während der akuten Leberschädigung nach der DPO Applikation supprimiert die Aktivierung der Ito-Zellen mit der daraus folgenden geringeren Ausprägung der Fibrogenese [Sigal et al 2010]. Als Abwehrmechanismus bei der obstruktiven Cholestase wird die mRNA-Expression von Lhx2, dem inhibierenden Transkriptionsgen von aktivierten Itozellen, enorm gesteigert. Bei den DPO-behandelten Tieren scheint diese Regulation von weniger Nutzen sein. Die eher gering ausgeprägte Steigerung der mRNA-Expression von Lhx2 in den mit DPO-behandelten Tieren ist eher als Folge der anti-inflammatorischen Wirkung von DPO α zu betrachten.

Die Tatsache, dass die pleiotrope Wirkung von EPO auf den Einfluss von etlichen Signaltransduktionsabläufen basiert, könnte unsere Aussage über die indirekte Expressionsbeeinflussung der Transportproteine bestärken. EPO induziert JAK-2 (Janus-Kinase 2) sowie STAT5 (Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator 5) abhängige Signaltransduktionskaskaden, aktiviert die JNK (c-Jun N –terminale Kinase)- und MAPK (Mitochondrien aktivierende Proteinkinase)-Signalwege [Nairz et al. 2012] und greift dabei in die Bildung zahlreicher Zytokine ein. Der protektive Effekt könnte folglich auf die verminderte Aktivität der durch JNK vermittelten Signalkaskade sowie der daraus resultierenden herabgesetzten TNF α - und IL β -Aktivität zurück zu führen sein [Ben-Ari et al. 2011, Le Minh et al. 2007, Nairz et al. 2012]. In diesem Zusammenhang scheint es eine reduzierte NTCP-Genexpression während der Cholestase durch den JNK-abhängigen Abfall von NTCP-Katalysatoren, wie HNF-1 und RXR:RAR, zu geben [Li et al 2002]. Daraus folgt, dass der Abfall von NTCP-Expression bei den mit DPO-behandelten Tieren durch die Reduktion der DPO-abhängigen JNK-Aktivität vermittelt sein kann. Andererseits kann diese aber auch

Diskussion

durch die Aktivierung von pro- inflammatorischen Zytokinen vermittelt sein [Gupta et al. 2001].

Die vorliegenden Ergebnisse dieser experimentellen Studie liefern nicht die ausreichenden Beweise für einen direkten Zusammenhang zwischen der antifibrotischen Wirkung von DPO α und der Regulation von hepatobiliären Transportproteinen.

Zusammenfassend konnte aus den vorliegenden Ergebnissen der experimentellen Studie kein direktes Ursache-Wirkungs-Prinzip zwischen der Regulation der Transportproteine während der obstruktiven Cholestase und der gewebsschutzenden Wirkung von DPO α etabliert werden. Womöglich sind die beobachteten Veränderungen in der Expression der Transportproteine während der Cholestase ein Ausdruck der sekundären anti-inflammatorischen Wirkung von DPO α .

6.2.3 Überlebensstudie

Die Hypothese über den anti-fibrotischen Effekt von DPO α während der chronisch langanhaltenden Leberschädigung konnte in dieser experimentellen Studie nicht belegt werden. Es konnte kein Überlebensvorteil in der mit DPO-behandelten Gruppe demonstriert werden. Die Überlebensrate sinkt sowohl bei den mit DPO-behandelten als auch bei -unbehandelten Tieren. Die Ursache für diesen eher konträren Effekt der Behandlung könnte verschiedener Natur sein. Wann die Chronifizierung der Fibrose einsetzt und ab wann der Prozess irreversibel wird, ist bei dem Mausmodell nicht exakt erforscht. Basierend auf den Erkenntnissen aus der Studie von Georgiev et al. über den zeitlichen Ablauf der Fibrose, erreicht die Fibrose nach 3-5 Tagen ihren Höhepunkt der Ausprägung [Georgiev et al 2007]. Der 7. postoperative Tag wurde gewählt, um die fortgeschrittene Fibrose zu simulieren. Ob zu diesem Zeitpunkt der Fibrosierungsprozess schon irreversibel war, ist nicht eindeutig evaluiert. Desweiteren ist aus den vorangegangenen Studien bekannt, dass die Fibrose die gesunde Leberarchitektur sowie die Verbindung zwischen den Zellen zerstört [Friedman 2008, Brenner et al. 2009]. Der Transport von EPO in die Zelle wird verlangsamt, wenn nicht sogar verhindert. Damit ist die Frage der richtigen Dosierung von DPO α zur Behandlung der Tiere fraglich. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung der Versuchstiere mit DPO α während der langanhaltenden chronischen Leberschädigung keinen Überlebensvorteil aufzeigt. Der genauere anti-fibrotische hepatoprotektive Wirkmechanismus von EPO bzw. DPO α während der

Diskussion

extrahepatischen Cholestase bleibt damit ungeklärt und sollte in nachfolgenden Studien weiter erforscht werden.

Zusammenfassung und Ausblick

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Regulation der Transportproteine während der extrahepatischen Cholestase sowie deren Beeinflussung mittels einem Erythropoetinderivat DPO α an einem etablierten Modell der Gallengangsligatur zu untersuchen. Mit Hilfe von biochemischen sowie molekularbiologischen Untersuchungstechniken konnte die Expression der Transportproteine während der Cholestase untersucht werden. Die anti-fibrotische gewebsschutzende Wirkung von DPO α während der chronischen Cholestase wurde zusätzlich an Hand der Überlebensstudie untersucht.

Zusammenfassend wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die therapeutische Gabe von DPO α bei chronischer Leberschädigung zeigt keinen Überlebensvorteil am Überlebensmodell. Durch die repetitive Gabe des DPO α bei langanhaltender Fibrosierung scheint die protektive Wirkung sich aufzuheben.
2. Die anti-fibrotische gewebsschutzende Wirkung von DPO α bei der akuten Leberschädigung wirkt langanhaltend. Der anti-fibrotische, anti-nekrotisierende Effekt des DPO α konnte auch nach 28 Tagen bestätigt werden.
3. Die Expression der Transportproteine auf der basolateralen Membran wird während der akuten Cholestase herab reguliert, um den Gallensäuretransport in die Zelle zu minimieren.
4. Die Expression der Transporterproteine auf der kanalikulären Seite verlief unterschiedlich. Der BSEP-Transporter wurde signifikant hoch reguliert, um die Elimination der gewebsschädlichen Gallensäuren zu erhöhen. Der MRP2-Transporter dagegen wurde herab reguliert, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.
5. Die Expression der „Hilfs-Transportproteinen“ auf der basolateralen Membran zur Unterstützung der kanalikulären Efflux-Transporter wurde wie erwartet hochreguliert, um der Leberschädigung entgegenzuwirken.
6. Insgesamt lässt sich die Regulation der Transportproteine durch DPO α jedoch nicht beeinflussen. Die anti-fibrotische Wirkung von DPO α spielt sich damit wohl nicht auf der molekularen Ebene in der Regulation der Transportproteine ab.

Zusammenfassung und Ausblick

7. Die Aktivierung der Ito-Zellen während der Fibrose wird vom Lhx2-Transkriptor inhibiert. Seine Expression steigt enorm nach der BDL. Dieses wird von DPO α aber nicht beeinflusst.

Die aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass die veränderte Expression der Transportproteine während der Cholestase eine protektive schützende Antwort der Zelle auf den schädigenden Reiz darstellt. Die eindeutige Regulation der Transportproteine durch DPO α konnte jedoch nicht demonstriert werden. Der Einsatzort für die anti-fibrotische, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkung von DPO α liegt somit wahrscheinlich nicht auf der molekularen Ebene in der Regulation der Transportproteine und bleibt damit weiterhin ungeklärt.

Die Regulation der Transportproteine anhand der neuesten Studien findet auf der Transkriptionsebene statt. Zum einen über die nukleären Hormonrezeptoren, deren aktivierende Liganden Gallensäuren und Xenobiotika darstellen und zum anderen über hepatozytenspezifische Transaktivatoren [Geier et al. 2004]. Die hohe intrahepatische Konzentration der Gallensäuren aktiviert den nukleären Rezeptor FXR (farnesoid S receptor alpha) [Trauner et al. 2016]. Zusammen mit dem PXR (pregnane X receptor) stellen die beiden den wichtigsten Indikator für die Regulation des Gallensäureflusses im enterohepatischen Kreislauf dar [Yue et al. 2009, Geier et al. 2004]. Durch die Aktivierung des FXR wird die Synthese der Gallensäuren gedrosselt, indem die Produktion des Cytochroms CYP P450 herab reguliert wird. Weiterhin werden Adaptionsprozesse angestoßen, um der Schädigung entgegen zu wirken. Die Aufnahme von Gallensäuren in die Zelle wird durch die herabgesetzte Expression von NTCP gedrosselt [Zollner et al. 2005] und der Efflux der Gallensäuren durch die gesteigerte Expression von BSEP gesteigert [Yue et al. 2016, Zhu et al. 2016, Trauner et al. 2016, Arab et al. 2017]. Es lässt sich demzufolge mutmaßen, dass der Eingriff in die Regulation der Transportproteine durch die besseren Erkenntnisse auf der molekularen Ebene neue Türen in der Entwicklung von Therapieansätzen der Leberfibrose öffnen. Denn für die Behandlung der Cholestase ist die Reduktion der hepatischen und systemischen Akkumulation von Gallensäuren und deren Metaboliten in der Zelle entscheidend [Wagner et al. 2016]. Solche Anpassungsmechanismen wie die gesteigerte Expression von MRP4 und MRP5 beispielsweise während der Cholestase würde den alternativen Transport der Gallensäuren aus dem Hepatozyten erhöhen und damit der Cholestase entgegenwirken [Wagner et al. 2016].

Zusammenfassung und Ausblick

Neben der Regulation der Transportproteine über diese spezifischen Transkriptionsfaktoren scheinen Zytokine eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung zu haben. Interferone und Interleukine sind in dem Substratspektrum der Transportproteine enthalten. Es ist gezeigt worden, dass die gesteigerte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen bei der Leberschädigung zur Herabregulation von NTCP bei der Cholestase führen [Geier et al. 2004, Zhu et al. 2016, Arab et al. 2017, Trauner et al. 2016]. Die aktivierten Ito-Zellen scheinen bei der Regulation der Transportproteine auch eine Rolle zu spielen, indem sie die Expression von MRP3, 4, und 5 hochregulieren [Hanninvoort & Dunning 2008]. Die Regulation der Transportproteine stellt damit einen sehr komplexen Prozess dar, so dass es weiterhin neuer Erkenntnisse auf der molekularen Ebene bedarf bzw. das tiefere Verständnis in der Regulation des Gallensäureflusses durch die Beeinflussung der Transportproteine erforderlich ist, um neue möglichst wirksame molekulare Therapieansätze zur Behandlung chronisch cholestatischer Erkrankungen zu entwickeln.

Thesen zur Dissertation

8 *Thesen zur Dissertation*

1. Eine adäquate kausale Therapie zur Behandlung chronisch fortgeschrittener Leberkrankungen außer der orthotopen Lebertransplantation existiert bis heute nicht.
2. Aufgrund des starken Spendeorganmangels sind alternative Therapieansätze dringendst erforderlich.
3. Zur Etablierung neuer Therapieansätze ist das Verständnis der Fibrosierungsfolgen auf der molekularen Ebene in der Regulation der Transportproteine erforderlich.
4. Die verminderte Expression der basolateralen Transportproteine sowie die erhöhte Expression von kanalikulären Efflux-Transportproteinen und BSEP bei der Cholestase stellen einen physiologischen gewebsschutzmechanismus dar.
5. Die gewebsschutzmechanische antifibrotische Wirkung von EPO bei der akuten Leberschädigung erfolgt scheinbar nicht über die Regulation der Transportproteine auf der molekularen Ebene.
6. Die viel versprechende therapeutische Wirkung von EPO bei der chronisch fortgeschrittenen Leberschädigung konnte in aktueller Studie nicht bestätigt werden. Die Behandlung mit EPO bei der chronischen Leberschädigung brachte keinen Überlebensvorteil. Die protektive Wirkung von EPO schlägt sich dabei eher in eine profibrotische um.
7. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen auf, dass EPO nur zur Behandlung von akuten cholestatischen, nicht jedoch von chronischen Leberschädigung geeignet ist.
8. Der Angriffspunkt von EPO ist damit noch nicht ausreichend erforscht und benötigt für das Verständnis dessen gewebsschutzmechanischen Wirkung weiterer Studien.

Abbildungsverzeichnis

9 Abbildungsverzeichnis

- Tabelle 1** *Klinische und laborchemische Parameter zur Diagnose einer Leberschädigung.*
- Tabelle 2** *Allgemeine Daten zur Struktur und zu den Eigenschaften von Darbepoetin alfa.*
- Tabelle 3** *Primersequenzen für die real time PCR.*
- Tabelle 4** *Konzentration von Bilirubin in Plasma, histologisch gesicherte Galleninfarkte sowie die mRNA Expression von Kollagen-(I)- α in Sham-operierten Tieren ($n = 3 - 4$) und Tieren am Tag 28 nach BDL und Gabe von DPO α (**DPO**) oder 0,9% NaCl (**Kontrolle**). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.*
- Abbildung 1** *Die primäre Struktur (A) und die Globusformation aus vier Helices (B) von Erythropoetin. Quelle: Lappin, 2003.*
- Abbildung 2** *Schematische Darstellung der hepatobiliären Transporterproteine auf der basolateralen Seite (NTCP, OATP, Mrp4 und Mrp5) sowie auf der apikalen Membran (BSEP und Mrp2). Modifiziert nach Keppler et al., 2011.*
- Abbildung 3** *Relative Expression der basolateralen Transportproteine NTCP (**links**) sowie OATP2b1 (**rechts**) der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach BDL und Gabe von DPO α (**D**; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (**C**; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (**S**; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.*
- Abbildung 4** *Relative Expression der apikalen Transportproteine MRP2 (**rechts**) und BSEP (**links**) der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach BDL und Gabe von DPO α (**D**; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (**C**; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (**S**; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.*
- Abbildung 5** *Relative Expression der basolateralen Transportproteine MRP4 (**links**) und MRP5 (**rechts**) der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach BDL und Gabe von DPO α (**D**; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl*

Abbildungsverzeichnis

(**C**; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (**S**; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; * $p < 0,05$ vs. Sham (S), # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

Abbildung 6 Relative Expression der mRNA (links) und des Proteins (rechts) von Lhx2 der Mäuse 2, 5, 14 und 28 Tage nach der BDL und Gabe von DPO (D; hellgraue Balken) oder 0,9% NaCl (C; schwarze Balken) sowie der Sham-operierten Tiere (S; dunkelgraue Balken). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; * $p < 0,05$ vs. Sham (S), # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (K).

Abbildung 7 Kaplan-Maier-Überlebenskurve der Mäuse nach BDL. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Kontrollgruppe (NaCl), die durchgezogene Linie steht für die DPO-Gruppe. Der Log-rank Test ergab keinen signifikanten Unterschied $p > 0,05$

Literaturverzeichnis

10 Literaturverzeichnis

1. Alrefai WA, Gill RK. 2007. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 24:1803-23
2. Allam A, Gabr S, Ajarem J, Abdel-Maksoud M. Bcl-2 and p53 expression in hepatic tissues of Egyptian patients with Chronic Hepatitis C. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 2015; 65 (11): 1186–1192.
3. Arab Juan P.Saul J. Karpen, Paul A. Dawson, Marco Arrese and Michael Trauner Bile Acids and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Molecular Insights and Therapeutic Perspectives *Reviews Hepatology* Vol. 65, NO. 1, 2017
4. Barner G, Wagner M, Moustafa T, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, Fuchsbichler A, Halilbasic E, Denk H, Marschall HU and Trauner M. Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/ beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G923-G932.
5. Barnes SN, Aleksunes LM, Augustine L, Scheffer GL, Goedken MJ, Jakowski AB, Pruijboom-Brees IM, Cherrington NJ and Manautou JE. Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1963-1969.
6. Bataller R, Brenner D. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 2005; 115 (2): 209–218.
7. Ben-Ari Z, Zilbermintz V, Pappo O, Avlas O, Sharon E, Greif F, Cheporko Y, Ravid A, Shapiro R and Hochhauser E. Erythropoietin increases survival and attenuates fulminant hepatic failure injury induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide in mice. *Transplantation* 2011; 92: 18-24.
8. Benyon RC, Iredale JP Is liver fibrosis reversibel? 2000 *Gut* 2000; Apr. 46(4):443-6
9. Brackova E, Fuksa L, Cermanova J, Kolouchova G, Hroch M, Hirsova P, Martinkova J, Staud F and Micuda S. Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 1978-1985.
10. Brenner DA Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2009;120:361-8. Review.
11. Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med* 2008; 264:405–432.
12. Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 347-357, 1999
13. Borst Piet, Raymond Evers, Marcel Kool, Jan Wijnholds A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins review *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 16, August 16, 2000
14. Borst P. de Wolf C, van de Wetering K Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch.* 2007 Feb;453(5):661-73. Epub 2006 Apr 4.
15. Boyer, J.L. and Nathanson, M.H. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14:551-566, 1991.
16. Boyer, J.L., Graf, J., and Meier, P.J. Hepatic transport systems regulating pH_i, cell volume, and bile secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 54:415-438, 1992

Literaturverzeichnis

17. Chai J, Luo D, Wu X, Wang H, He Y, Li Q, Zhang Y, Chen L, Peng ZH, Xiao T, Wang R and Chen W. Changes of organic anion transporter MRP4 and related nuclear receptors in human obstructive cholestasis. *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 996-1004.
18. Cheng Xingguo, David Buckley, Curtis D. Klaassen Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep Expression *Biochem Pharmacol*. 2007 Dec 3;74(11):1665-76. Epub 2007 Aug 19
19. Constandinou C, Henderson N, Iredale J. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods in molecular medicine*, 2005; 117: 237–250.
20. Desmet VJ and Roskams T 2004 Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth 2004 *Journal of Hepatology* 40 (2004) 860–867
21. Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J and Haussinger D. 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* 2007; 293: G1134-G1146.
22. Dunst J. Management of anemia in patients undergoing curative radiotherapy. Erythropoietin, transfusions, or better nothing? *Strahlenther Onkol* 2004; 180:671-681.
23. Eckardt KU. After 15 years of success- perspectives of erythropoietin therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1745-1749.
24. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer*. 2001 Apr;84 Suppl 1:3-10. Review.
25. Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J. Gastroenterol*. 2008 Oct 7;14(37):5641-9.
26. Fausto, N., Campbell, J.S. & Riehle, K.J., Liver regeneration. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl1): S.45-53.
27. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, Marschall HU, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Denk H, Trauner M Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1238-51.
28. Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology*. 1992 Feb;15(2):234-43.
29. Friedman S. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 2003; 38 Suppl 1: 53.
30. Friedmann Scott Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis 2008 *Gastroenterology*. 2008 May; 134(6): 1655–1669. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.003.
31. Friedman S. Hepatic Stellate Cells. *Physiological Reviews*, 2008; 88 (1): 125–172
32. Garton C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ and Boyer JL. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1996; 110: 199-209
33. Gatzert M, Pausch J. Therapie cholestatischer Lebererkrankungen. *Medizinische Klinik* 2002; 97:152-9
34. Geier Andreas, Priv.-Doz. Dr. Carsten Garton, Christoph G. Dietrich, Frank Lammert, Hermann E. Wasmuth, Siegfried Matern Diagnosis of cholestatic disorders *Med Klin (Munich)*. 2003 Sep 15;98(9):499-509.

Literaturverzeichnis

35. Geier A., C. Gartung, S. Matern, Regulation of hepatobiliary transporters in cholestatic liver disease, *Med Klein* 2004; 99:7-17
36. Geier A, Dietrich CG, Trauner M, Gartung C. Extrahepatic cholestasis downregulates Oatp1 by TNF-alpha signalling without affecting Oatp2 and Oatp4 expression and sodiumindependent bile salt uptake in rat liver. *Liver Int* 2007; 27:1056-65.
37. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protectiv cytokine. *Cell Death Differ* 2004; 11:37-44.
38. Ghiassi-Nejad Z, Friedman SL. Advances in antifibrotic therapy. *Expert Rev GastroenterolHepatol.* 2008; 2: 803-816
39. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang J, Nocito A, Dahm F, Clavien P. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *The British journal of surgery*, 2008; 95 (5): 646–656.
40. Glaspy J, Crawford J, Vansteenkiste J, Henry D, Rao S, Bowers P, Berlin JA, Tomita D, Bridges K, Ludwig H. Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes. *Br J Cancer.* 2010 Jan 19;102(2):301-15.
41. Glaspy JA. Darbepoetin alfa controversies, from dosage issues to safety concerns: the larger lesson. *Oncology (Williston Park).* 2011 Apr 30;25(5):423-4.
42. Graziadei Ivo, Heinz Zoller, Peter Fickert, Stefan Schneeberger, Armin Finkenstedt, Markus Peck-Radosavljevic, Helmut Müller, Claudia Kohl, Barbara Sperner-Unterweger, Stephan Eschertzhuber, Harald Hofer, Dietmar Öfner, Herbert Tilg, Wolfgang Vogel, Michael Trauner, Gabriela Berlakovich Indications for liver transplantation in adults *Wien Klin Wochenschr* (2016) 128:679–690
43. Gupta S, Stravitz RT, Dent P and Hylemon PB. Down-regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 15816-15822.
44. Hagenbuch B, Jacquemin E, Meier PJ. Na⁺-dependent and Na⁺-independent bile acid uptake systems in the liver. *Cell Physiol Biochem* 1994;4:198–205
45. Hagenbuch B Molecular Properties of Hepatic Uptake Systems for Bile Acids and Organic Anions. (1997) *J. Membrane Biol.* 160, 1-8
46. Hagenbuch N, Reichel C, Stieger B, Cattori V, Fattinger KE, Landmann L, Meier PJ and Kullak-Ublick GA (2001): Effect of phenobarbital on the expression of bile salt and organic anion transporters of rat liver. *J. Hepatol.* 34, 881-887
47. Hagenbuch B and Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447:653–665.
48. Hagenbuch B and Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 2008; 38: 778-801.
49. Hannivoort Rebekka A., Sandra Dunning, Sara Vander Borght, Ben Schroyen, Jannes Woudenbergh, Fiona Oakley, Manon Buist-Homan, Fiona A. J. van den Heuvel, Mariska Geuken, Albert Geerts, Tania Roskams, Klaas Nico Faber and Han Moshage Multidrug Resistance–

Literaturverzeichnis

- Associated Proteins Are Crucial for the Viability of Activated Rat Hepatic Stellate Cells, *Hepatology*, Vol. 48, No. 2, 2008
50. Hisamitsu Hayashi and Yuichi Sugiyama Short-Chain Ubiquitination Is Associated with the Degradation Rate of a Cell-Surface-Resident Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11) *Mol Pharmacol* 75:143–150, 2009
 51. Ho Richard H., Brenda F. Leakeb, Dawn M. Kilkennyc, Henriette E. Meyer zu Schwabedissene, Hartmut Glaeserf, Deanna L. Kroetzd and Richard B. Kim Polymorphic variants in the human bile salt export pump (BSEP; ABCB11): functional characterization and interindividual variability *Pharmacogenetics and Genomics* 2010, 20:45–57
 52. Hyogo H, Tazuma S, Nishioka T, Ochi H, Yamaguchi A, Numata Y, Kanno K, Sakomoto M, Asamoto Y, Tsuboi K, Nakai K, Yasumiba S, Sunami Y and Kajiyama G. Phospholipid alterations in hepatocyte membranes and transporter protein changes in cholestatic rat model. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2089-2097.
 53. Ishak KF & Zimmermann HJ Morphologic spectrum of drug-induced hepatic disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 1995 Dec;24(4):759-86. Review.
 54. Iredale J. Models of liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 2007; 117 (3): 539–548.
 55. Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. 1994. Expression cloning of a rat liver Nap-independent organic anion transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91(1):133–137.
 56. Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol* 2004;83:673-686.
 57. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004;43:649-659.
 58. Jia J, Han D, Xu R, Gao F, Zhao L, Zhao Y, Yan J, Ma X. Effect of endotoxin on fibronectin synthesis of rat primary cultured hepatocytes. *World journal of gastroenterology*, 1998; 4 (4): 329–331.
 59. Jingjing Jiao, Scott L. Friedman, and Costica Aloman Hepatic fibrosis *Curr Opin Gastroenterol.* 2009 May ; 25(3): 223–229.
 60. Joyeux-Faure M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 323: 759-762
 61. Kanno K, Tazuma S, Niida S and Chayama K. Unique reciprocal changes of hepatocellular membrane transporter expression and fluidity in rats with selective biliary obstruction. *Hepatol Res* 2003; 26:157-163.
 62. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 2005; 353(12):1261–73.
 63. Kast C & Gros P Topology Mapping of the Amino-terminal Half of Multidrug Resistance-associated Protein by Epitope Insertion and Immunofluorescence. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 26479-26487
 64. Keppler D. Cholestasis and the role of basolateral efflux pumps. *Z Gastroenterol* 2011; 49:1553-1557
 65. Klaassen Curtis D. and Hong Lu Xenobiotic Transporters: Ascribing Function from Gene Knockout and Mutation Studies *Toxicological Sciences* 101(2), 186–196 Review 2008

Literaturverzeichnis

66. Klaassen Curtis D. & Lauren M. Aleksunes Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters:Function and Regulation *Pharmacol Rev* 62:1–96, 2010
67. Kis Emese, Eniko Ioja, Tunde Nagy, Lajos Szente, Krisztina Here di-Szabo, and Peter Krajcsi Effect of Membrane Cholesterol on BSEP/Bsep Activity: Species Specificity Studies for Substrates and Inhibitors *Drug metabolism and Disposition* Vol. 37, No. 9, *DMD* 37:1878–1886, 2009
68. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJT, Juijn J, Baas F and Borst P:Analysis of the Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. *1997 Cancer Res.* 57, 3537-3547
69. Kusters A and Karpen SJ. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica* 2008;38: 1043-1071.
70. Kountouras J, Billing B, Scheuer P. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology*, 1984; 65 (3): 305–311.
71. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med.* 2006;354(1):54–66.
72. Kredel M, Brederlau J, Roewer N, Wunder C. Cholestasis and liver dysfunction in critical care patients *Anaesthesist.* 2008 Dec;57(12):1172-82. doi: 10.1007/s00101-008-1459-y.
73. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ. Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis.* Vol. 20, No.3, 2000;20(3):273-92.
74. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ and Hagenbuch B. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 2001; 120:525-533.
75. G.A. Kullak-Ublick, U. Beuers, C. Fahney, B. Hagenbuch, P.J. Meier, G. Paumgartner, Identification and functional characterization of the promoter region of the human organic anion transporting polypeptide gene, *Hepatology* 26 (1997) 991–997.
76. Kuntz E, Kuntz H. *Hepatology textbook and atlas.* Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg 2008.
77. Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis.* 2010 May;30(2):125-33. Review.
78. Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist* 2003;8:15-18.
79. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2013; 6 (1): 19.
80. Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD and Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 2007; 170: 1954-1963.
81. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, et al.: Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009; 89(1): 147–91.
82. Li D, Zimmerman TL, Thevananther S, Lee HY, Kurie JM and Karpen SJ. Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J Biol Chem* 2002; 277: 31416-31422.

Literaturverzeichnis

83. Lickteig AJ, Slitt AL, Arkan MC, et al. 2007. Differential regulation of hepatic transporters in the absence of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and nuclear factor-kappaB in two models of cholestasis. *Drug Metab Dispos* 35:402-9
84. Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A and Tsai LY. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31:383-390.
85. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*.2009;360(26):2758–69.
86. Macdougall Iain C., Desmond Padhi² and Graham Jang Pharmacology of darbepoetin alfa *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jun;22 Suppl 4:iv2-iv9. Review.
87. Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 2005;33:956–62
88. Menger MD, Richter S, Yamauchi JI, Vollmar B. Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Ann Acad Med Singapore*. 1999;28(4):542-56.
89. Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Harry K, Adachi M, Hagey L, Schuetz JD and Boyer JL. Mrp4^{-/-} mice have an impaired cytoprotective response in obstructive cholestasis. *Hepatology* 2006;43: 1013-1021
90. Mennone A, Soroka CJ, Harry KM and Boyer JL. Role of breast cancer resistance protein in the adaptive response to cholestasis. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 1673-1678.
91. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131:1728-34
92. Müller M, Jansen PL. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol* 1997;272:G1285-G1303
93. Nairz M, Schroll A, Moschen AR, Sonnweber T, Theurl M, Theurl I, Taub N, Jamnig C, Neutrauer D, Huber LA, Tilg H, Moser PL and Weiss G. Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways. *Immunity* 2011; 34: 61-74.
94. Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I and Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect* 2012; 14: 238-246.
95. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnerciks JK, Dixon PH, Williamson C and Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. *J Pathol* 2012; 226: 300-315.
96. Nies AT and Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 2007; 453: 643-659.
97. Ots PM, Carrizosa CL, Pérez AR, de Dios Saez Garrido J, Pérez JM. Darbepoetin versus epoetin alfa for the correction of anemia in cancer patients receiving radiotherapy or chemoradiotherapy treatment. *Clin Med Oncol*. 2008;2:393-9. Epub 2008 May 19.
98. Parsons Christopher J, Motoki Takashima and Richard A Rippe Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Mar;23(3):501-2
99. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 4445-4451
100. Pauli-Manus C, Meier PJ Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology* 2006;44:778-787.

Literaturverzeichnis

101. Paulusma CC and Oude Elferink RPJ The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. *J. Mol. Med.* 75,420-428, 1997
102. Paulusma CC, Kothe MJ, Bakker CT, Bosma PJ, van Bokhoven I, van Marle J, Bolder U, Tytgat GN and Oude Elferink RP. Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* 2000; 31: 684-693.
103. Pausch J, Gatzen M. 2006. Therapie cholestatischer Lebererkrankungen. *Internist (Berl)* 47:1239-44
104. Pfeifer Nathan, D., Rhiannon, N. Hardwick, and Kim L.R. Brouwer Role of Hepatic Efflux Transporters in regulating Systemic and Hepatocyte Exposure to Xenobiotics *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2014. 54:509–35
105. St-Pierre Marie V., Gerd A. Kullak-Ublick, Bruno Hegebug and Peter J. Meier Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues *Review The Journal of Experimental Biology* 204, 1673–1686(2001)
106. Pinter M, Trauner M, Peck-Radosavljevic M, Sieghart W. Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management. *ESMO Open.* 2016 Mar 17;1(2):e000042. eCollection 2016.
107. Plebani M, Panozzo MP, Basso D, De Paoli M, Biasin R and Infantolino D. Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 358-363.
108. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2000 Jun;21(3):49-98.
109. Roma MG, Crocenzi FA and Sanchez Pozzi EA. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 567-588.
110. Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Molecular carcinogenesis*, 1996 Mar;15(3):183-9.
111. Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1775-17793.
112. Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis.* 2005;23(3-4):264-74. Review.
113. Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B and Eipel C. Darbepoetin-alpha inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2010; 90: 1447-1456.
114. Sinclair Agnus M. Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity *Biologics.* 2013;7:161-74.
115. Slijepcevic D, van de Graaf SF. Bile Acid Uptake Transporters as Targets for Therapy. *Dig Dis.* 2017;35(3):251-258.
116. Slitt AL, Allen K, Morrone J, et al. 2007. Regulation of transporter expression in mouse liver, kidney, and intestine during extrahepatic cholestasis. *Biochim Biophys Acta* 1768:637-47
117. Sokol R J, Devereaux M, Dahl R, Gumprich E. "Let there be bile"--understanding hepatic injury in cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Jul;43 Suppl 1:S4-9.

Literaturverzeichnis

118. Sorg H., C. Krueger, T. Schulz, M. D. Menger, F. Schmitz, B. Vollmar: Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. In: *FASEB J.* 23, 2009, S. 3049–3058
119. Starkel P, Leclercq I. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 2011; 25 (2): 319–333.
120. Stowell RE, Lee CS, Tsuboi KK, Villasana A. Histochemical and microchemical changes in experimental cirrhosis and hepatoma formation in mice by carbon tetrachloride. *Cancer Res.* 1951 May;11(5):345-54.
121. Stieger B. Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis. *Drug Metab. Rev.* 42:437–45, 2010.
122. Stieger B and Beuers U. The canalicular bile salt export pump BSEP (ABCB11) as a potential therapeutic target. *Curr Drug Targets* 2011; 12: 661-670.
123. Sturm E, Havinga R, Baller JF, Wolters H, van Rooijen N, Kamps JA, Verkade HJ, Karpen SJ and Kuipers F. Kupffer cell depletion with liposomal clodronate prevents suppression of Ntcp expression in endotoxin-treated rats. *J Hepatol* 2005; 42: 102-109.
124. Tao L, Zhai Y, Di Ding, Yin W, Liu X, Yu G. The role of C/EBP-alpha expression in human liver and liver fibrosis and its relationship with autophagy. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015; 8 (10): 13102–13107.
125. Thakkar N, Slizgi JR, Brouwer KLR. Effect of Liver Disease on Hepatic Transporter Expression and Function. *J Pharm Sci.* 2017 Sep;106(9):2282-2294.
126. Tivoli Y.A. & Richard M. Rubenstein Pruritus an updated look at an old problem 2009; (*J Clin Aesthetic Dermatol.* 2009;2(7):30–36. PMID: PMC2924137 Additional article information
127. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, Suchy FJ, Keppler D and Boyer JL. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 1997; 113: 255-264.
128. Trauner M. Molecular Alterations of Canalicular Transport Systems in Experimental Models of Cholestasis: Possible Functional Correlations *Yale J Biol Med.* 1997 Jul-Aug;70(4):365-78.
129. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2003; 83: 633-671
130. Trauner M, Fickert P, Halilbasic E, et al. 2008. Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. *Wien Med Wochenschr* 158:542-8
131. Wagner M, Fickert P, Zollner G, Fuchsichler A, Silbert D, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Guo GL, Schuetz JD, Gonzalez FJ, Marschall HU, Denk H and Trauner M. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 825-838.
132. Wagner M, Trauner M. Recent advances in understanding and managing cholestasis. *F1000Res.* 2016 Apr 19;5. pii: F1000 Faculty Rev-705. doi: 10.12688/f1000research.8012.1. eCollection 2016. Review.
133. Walkin L, Herrick S, Summers A, Brenchley P, Hoff C, Korstanje R, Margetts P. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis & tissue repair*, 2013; 6 (1): 18.

Literaturverzeichnis

134. Wandzioch E, Kolterud A, Jacobsson M, Friedman SL and Carlsson L. Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16549-16554.
135. Wu CC, Possible therapies of septic shock: based on animal studies and clinical trials. *Curr Pharm Des.* 2006;12(27):3535-41.
136. Xinsheng Gu and Jose E. Manautou Regulation of hepatic ABC transporters by xenobiotics and in disease states *Drug Metab Rev.* 2010 August; 42(3): 482–538.
137. Yamada Y, Kobayashi H, Iwasa M, Sumi S, Ushikoshi H, Aoyama T, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara T, Fujiwara H, Kiso M, Minatoguchi S. Postinfarct active cardiac-targeted delivery of erythropoietin by liposomes with sialyl Lewis X repairs infarcted myocardium in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Apr 15;304(8):H1124-33.
138. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 1993;81:2223-2236.
139. Zhu C., C.D. Fuchs, E. Halilbasic, M. Trauner Bile acids in regulation of inflammation and immunity: friend or foe? *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34 (Suppl. 98):S25-S31.
140. Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, Zatloukal K and Trauner M. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2001; 33:633-646.
141. Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Stumptner C, Zatloukal K, Denk H and Trauner M. Induction of short heterodimer partner 1 precedes downregulation of Ntcp in bile duct ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G184-G191.
142. Melitta Penz-Österreicher, Christoph H. Österreicher, and Michael Trauner Fibrosis in Autoimmune and Cholestatic Liver Disease Published as: *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011 April ; 25(2-4): 245–258.

Danksagung

11 Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit ist im Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock entstanden und ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die zu diesem Werk beigetragen und mir das Vollenden der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Institut durchführen zu können, für Ihre intensive und exzellente fachliche Betreuung. Ihr menschliches Verständnis und ihre Art, mich zu ermutigen, in jeder Lebenslage für mich da zu sein. Auch nach Jahren unermüdet mir Trost, Aufmunterung und Motivation zu schenken, weiter zu machen, sich zu entwickeln um das vorliegende Werk doch zu vollenden. Dank der intensiven Zusammenarbeit und Ihrer ständigen Hilfsbereitschaft beim Erfassen dieser Studie habe ich gelernt, nicht nur wissenschaftlich zu arbeiten, Eigeninitiative zu zeigen, sondern auch nicht aufzugeben, das mich nicht nur fachlich, sondern viel mehr auch persönlich gestärkt hat.

Meinen höchsten Dank gilt natürlich meiner Familie und meinen Eltern, die mich ständig unterstützt und mir den Rücken freigehalten haben, ohne eigene Interessen in den Vordergrund zu stellen. Meinem liebsten Mann und meiner Tochter, die es mir gezeigt haben, wofür und vor allem für wen ich schaffe.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Chirurgie danken, insbesondere Kerstin Abshagen und den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Berit Blendow, Doris Butzlaff und Dorothea Frenz für die stetige Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung in allen Fragen rund um die vorliegende Arbeit.

Zuletzt danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft für eine immer freundliche und entspannte Arbeitsatmosphäre in dieser Abteilung sorgten.

Selbstständigkeitserklärung

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation zum Thema:

**„Die Regulation der hepatobiliären Transportproteine bei Behandlung der
Leberfibrose mit Darbepoetin- α “**

eigenständig und ohne die unzulässige Hilfe von dritten verfasst wurde. Ich versichere hiermit, dass darüber hinaus keine weiteren Hilfsmittel als die aufgeführten verwendet wurden.

Münzenberg, der 05. Januar 2018

Elena Papenhagen