



Claudia Mäck (Autor)

**Interzelluläre Signaltransduktion durch Cytokine in
der Leber: Induktion von Akut-Phase-Proteinen in
Hepatocyten und Adhäsionsmolekülen in
Sinusoidalen Endothelzellen durch Anaphylatoxin
C5a- und LPS-abhängige Cytokin-Freisetzung aus
Kupferzellen**

**Interzelluläre Signaltransduktion
durch Cytokine in der Leber
Induktion von Akut-Phase-Proteinen in Hepatocyten und
Adhäsionsmolekülen in Sinusoidalen Endothelzellen
durch Anaphylatoxin C5a- und LPS-abhängige
Cytokin-Freisetzung aus Kupferzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Claudia Mäck
aus Northeim

Göttingen 2001

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3505>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 Funktion der Parenchym- und Nichtparenchymzellen in der Leber	3
1.2 Auslöser und Mediatoren von Entzündungsreaktionen	5
<i>Die Anaphylatoxine C3a und C5a</i>	5
<i>Bakterielle Lipopolysaccharide als Auslöser der Komplementaktivierung</i>	7
<i>Die Leber als primäres Zielorgan für Anaphylatoxine und LPS</i>	8
1.3 Beteiligung der Leberzellen an Entzündungsreaktionen	10
<i>Prostanoid-vermittelte Abwehrreaktionen der Leber</i>	10
<i>Cytokin-vermittelte Abwehrreaktionen der Leber</i>	10
1.4 Aufgabenstellung	13
2. MATERIAL	15
2.1 Tiere und Tierhaltung	15
2.2 Geräte	15
2.3 Chemikalien und Biochemikalien	16
2.4 Verbrauchsmaterialien	18
2.5 Reinigungs- und Nachweissysteme	18
2.6 Antikörper	19
2.7 Enzyme	19
2.8 Bakterien und Vektoren	21
2.9 Oligonukleotide	22
2.10 Stammlösungen und Zellkulturmedien	23
3. METHODEN	27
TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	27
3.1 <i>In vivo</i> Modelle	27
3.1.1 LPS-behandelte Ratten	27
3.1.2 Tetrachlorkohlenstoff (CCl ₄)-behandelte Ratten	27
ZELL- UND ORGANBIOLOGISCHE METHODEN	27
3.2 Isolierung von Kupfferzellen und Sinusoidalen Endothelzellen	27
3.2.1 Nicht-rezirkulierende <i>in situ</i> Präperfusion der Rattenleber	28
3.2.2 Rezirkulierende <i>ex situ</i> Perfusion	29
3.2.3 Separation von Kupfferzellen und Sinusoidalen Endothelzellen	29

3.3	Isolierung von Perisinusoidalzellen (Ito-Zellen)	32
3.3.1	Leberperfusion	34
3.3.2	Reinigung der Perisinusoidalzellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation	34
3.4	Collagenase-freie Isolierung von Hepatocyten	35
3.4.1	Leberperfusion	36
3.4.2	Reinigung der Hepatocyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation	36
3.5	Zellkultivierung	36
3.5.1	Monokultur von Kupfferzellen	36
3.5.2	Monokultur von Sinusoidalen Endothelzellen	37
3.5.3	Monokultur von Perisinusoidalzellen	38
3.5.4	Monokultur von Hepatocyten	38
3.5.5	Kokulturen von Kupfferzellen oder Sinusoidalen Endothelzellen mit Hepatocyten	38
3.6	Zellkulturexperimente	39
3.6.1	Stammlösungen	39
3.6.2	Gewinnung von Gesamt-RNA für Northern Blot-Analyse und cDNA-Synthese	40
3.6.3	Gewinnung von Zellkulturüberständen	40
3.6.4	Gewinnung von Zelllysaten	40
3.7	Isolierte Leberperfusion	41
	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	43
3.8	Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Parenchym- und Nichtparenchymzellen	43
3.9	Synthese von cDNA	43
3.10	PCR (Polymerase Chain Reaction)	45
3.10.1	Klassische PCR	45
3.10.2	PCR-Protokolle	46
3.10.3	Analyse der PCR-Produkte durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese	47
3.10.4	Quantifizierung von mRNA mittels LightCycler Polymerase Chain Reaction (LC-PCR) und Schmelzkurvenanalyse	48
3.10.5	Herstellung von Standards für die quantitative PCR	51
3.10.6	Sequenzierung der PCR-Produkte	52
	<i>Sequenzierreaktion</i>	52
	<i>Reinigung der Proben und EDV-gestützte Auswertung der Sequenzierung</i>	53
3.11	Northern-Blot Analyse	54
3.11.1	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	53
3.11.2	Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembran	56
3.11.3	Detektion transferierter RNA durch Hybridisierung mit sequenz-spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden	57
3.11.4	Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden	59
3.11.5	Transformation von <i>E. coli</i>	60
3.11.6	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Minipräparation)	61
3.11.7	<i>In vitro</i> -Transkription	63

BIOCHEMISCHE METHODEN	64
3.12 Proteinbestimmung nach Bradford	64
3.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; LAEMMLI)	65
3.14 Western Blot-Analyse	68
3.14.1 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulose	68
3.14.2 Detektion transferierter Proteine durch spezifische Antikörper	70
3.15 "Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay" (ELISA)	71
4. ERGEBNISSE	72
4.1 Induktion der Synthese proinflammatorischer Cytokine durch Anaphylatoxin C5a und LPS in Nichtparenchymzellen der Leber	72
4.1.1 Induktion der Cytokin-mRNA-Expression durch rrC5a und LPS in kultivierten Kupfferzellen	72
4.1.2 Induktion der IL-6-, TNF α - und IL1 β -mRNA-Expression durch Kostimulation mit rrC5a und LPS in kultivierten Kupfferzellen	73
<i>Zeitabhängigkeit</i>	73
<i>Dosisabhängigkeit</i>	75
4.1.3 Hemmung der rrC5a+LPS-abhängigen Expression von IL-6-, TNF α - und IL-1 β -mRNA durch Actinomycin D, von IL-1 β -mRNA auch durch Cycloheximid in kultivierten Kupfferzellen	76
4.1.4 Induktion der IL-6-, TNF α - und IL-1 β -Proteinsynthese durch Kostimulation mit rrC5a und LPS in kultivierten Kupfferzellen	78
4.1.5 Induktion von IL-6, TNF α und IL-1 β durch rrC5a und LPS in kultivierten Sinusoidalen Endothelzellen und Perisinusoidalzellen	80
4.2 Induktion von Akut-Phase-Proteinen durch C5a und LPS in Hepatocyten mittels Cytokin-Freisetzung aus Kupfferzellen	84
4.2.1 Induktion des positiven Typ-2 Akut-Phase-Proteins α_2 -Makroglobulin	85
<i>Induktion von α_2-Makroglobulin-mRNA in Hepatocyten durch konditionierte Medien rrC5a- und/oder LPS-stimulierter Kupfferzellen</i>	85
<i>Hemmung der durch konditionierte Kupfferzellmedien induzierten α_2-Makroglobulin-mRNA-Expression in Hepatocyten durch anti-IL-6-Antikörper</i>	86
<i>Unspezifische Hemmung der durch rrIL-6 induzierten α_2-Makroglobulin-mRNA-Expression in Hepatocyten durch anti-IL-1β-Antikörper</i>	87
<i>Fehlende Beteiligung von Prostanoiden an der durch konditionierte Kupfferzellmedien induzierten α_2-Makroglobulin-mRNA-Expression in Hepatocyten</i>	88
<i>Induktion von α_2-Makroglobulin-mRNA und -Protein durch rrC5a und/oder LPS in Hepatocyten-Kupfferzell-Kokulturen</i>	90
4.2.2 Induktion des positiven Typ-1 Akut-Phase-Proteins Hämopexin	91
<i>Induktion von Hämopexin-mRNA in Hepatocyten durch konditionierte Medien rrC5a- und/oder LPS-stimulierter Kupfferzellen</i>	91
<i>Hemmung der durch Kupfferzellmedien induzierten Hämopexin-mRNA-Expression in Hepatocyten durch anti-IL-6-, nicht durch anti-IL-1β- oder anti-TNFα-Antikörper</i>	92

4.2.3	Repression des „negativen“ Akut-Phase-Proteins Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	93
4.3	Induktion der Synthese von IL-1β-Präcursor durch rrC5a und LPS in Kupfferzellen, aber fehlende Freisetzung des reifen IL-1β	95
4.3.1	Stimulation der Synthese von IL-1 β -Präcursor, aber nicht von reifem IL-1 β durch rrC5a und LPS in kultivierten Kupfferzellen	95
4.3.2	Fehlender Einfluss von Nichtparenchymzellen und Hepatocyten auf die Prozessierung von Pro-IL-1 β in Kupfferzellen	97
4.3.3	Fehlende Freisetzung von reifem IL-1 β nach Stimulation mit LPS in der isoliert perfundierten Rattenleber	99
4.3.4	Freisetzung von reifem IL-1 β aus isolierten Kupfferzellen von <i>in vivo</i> mit LPS behandelten Ratten	101
4.4	Direkte und indirekte Induktion von Adhäsionsmolekülen durch C5a und LPS in Sinusoidalen Endothelzellen	102
4.4.1	Induktion der ICAM-1-, VCAM-1-, E-Selektin- und P-Selektin-mRNA-Expression durch LPS, aber nicht durch rrC5a in Sinusoidalen Endothelzellen	102
4.4.2	Induktion der ICAM-1-, VCAM-1-, E-Selektin- und P-Selektin-mRNA-Expression durch IL-1 β und/oder TNF α in Sinusoidalen Endothelzellen	103
4.4.3	Induktion der ICAM-1-, VCAM-1-, E-Selektin- und P-Selektin-mRNA-Expression in Sinusoidalen Endothelzellen durch konditionierte Medien rrC5a- und LPS-stimulierter Kupfferzellen	105
4.4.4	Steigerung der IL-1 β - und TNF α -induzierten E- und P-Selektin-mRNA-Expression in Sinusoidalen Endothelzellen unter dem Einfluss CCl ₄ -geschädigter Hepatocyten	107
5.	DISKUSSION	111
5.1	C5a- und LPS-induzierte Synthese der proinflammatorischen Cytokine IL-6, TNFα und IL-1β in Nichtparenchymzellen der Leber	111
	<i>C5a- und/oder LPS-induzierte IL-6-Freisetzung</i>	113
	<i>C5a- und/oder LPS-induzierte TNFα-Freisetzung</i>	114
	<i>Fehlende Freisetzung von IL-1β durch C5a und/oder LPS in Kupfferzellen</i>	114
	<i>C5a- und/oder LPS-induzierte Synthese von IL-1β-Präcursor in Kupfferzellen</i>	115
	<i>Freisetzung von reifem IL-1β aus Kupfferzellen LPS-behandelter Ratten</i>	117
5.2	Die proinflammatorischen Cytokine IL-6, TNFα und IL-1β als Mediatoren von Effektorfunktionen in der Leber	118
5.2.1	Vermittlung der Cytokineffekte über spezifische Rezeptoren auf Zielzellen	118
5.2.2	Synthese von Akut-Phase-Proteinen in Hepatocyten durch Cytokin-freisetzung aus Kupfferzellen	120
	<i>Induktion des positiven Typ-2 Akut-Phase-Proteins α_2-Makroglobulin</i>	120
	<i>Induktion des positiven Typ-1 Akut-Phase-Proteins Hämopexin</i>	122
	<i>Repression des „negativen“ Akut-Phase-Proteins Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase</i>	123

5.2.3	Expression von Adhäsionsmolekülen in Sinusoidalen Endothelzellen zur Rekrutierung von Leukocyten an den Entzündungsort	123
	<i>Direkte Wirkungen von C5a und LPS auf die Expression von Adhäsionsmolekülen</i>	124
	<i>Cytokin-vermittelte Wirkungen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen</i>	124
	<i>Einfluss einer akuten Leberschädigung auf die Expression von Adhäsionsmolekülen</i>	125
5.3	Fazit	127
	LITERATURVERZEICHNIS	128