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
Die Anaphylatoxine C3a und C5a 5
Bakterielle Lipopolysaccharide als Auslöser der Komplementaktivierung 7
Die Leber als primäres Zielorgan für Anaphylatoxine und LPS 8
1.3 Beteiligung der Leberzellen an Entzündungsreaktionen 10
Prostanoid-vermittelte Abwehrreaktionen der Leber 10
Cytokin-vermittelte Abwehrreaktionen der Leber 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 *In vivo* 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 *in situ* Präperfusion der Rattenleber 28
3.2.2 Rezirkulierende *ex situ* 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
Sequenzierreaktion 52
Reinigung der Proben und EDV-gestützte Auswertung der Sequenzierung 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 *E. coli* 60
3.11.6 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Minipräparation) 61
3.11.7 *In vitro*-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-, TNFα- und IL1β-mRNA-Expression durch Kostimulation mit rrC5a und LPS in kultivierten Kupfferzellen 73

Zeitabhängigkeit 73

Dosisabhängigkeit 75

4.1.3 Hemmung der rrC5a+LPS-abhängigen Expression von IL-6-, TNFα- und IL-1β-mRNA durch Actinomycin D, von IL-1β-mRNA auch durch Cycloheximid in kultivierten Kupfferzellen 76

4.1.4 Induktion der IL-6-, TNFα- und IL-1β-Proteinsynthese durch Kostimulation mit rrC5a und LPS in kultivierten Kupfferzellen 78

4.1.5 Induktion von IL-6, TNFα und IL-1β 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

Induktion von α_2-Makroglobulin-mRNA in Hepatocyten durch konditionierte Medien rrC5a- und/oder LPS-stimulierter Kupfferzellen 85

Hemmung der durch konditionierte Kupfferzellmedien induzierten α_2-Makroglobulin-mRNA-Expression in Hepatocyten durch anti-IL-6-Antikörper 86

Unspezifische Hemmung der durch rrIL-6 induzierten α_2-Makroglobulin-mRNA-Expression in Hepatocyten durch anti-IL-1β-Antikörper 87

Fehlende Beteiligung von Prostanoiden an der durch konditionierte Kupfferzellmedien induzierten α_2-Makroglobulin-mRNA-Expression in Hepatocyten 88

Induktion von α_2-Makroglobulin-mRNA und -Protein durch rrC5a und/oder LPS in Hepatocyten-Kupfferzell-Kokulturen 90

4.2.2 Induktion des positiven Typ-1 Akut-Phase-Proteins Hämopexin 91

Induktion von Hämopexin-mRNA in Hepatocyten durch konditionierte Medien rrC5a- und/oder LPS-stimulierter Kupfferzellen 91

Hemmung der durch Kupfferzellmedien induzierten Hämopexin-mRNA-Expression in Hepatocyten durch anti-IL-6-, nicht durch anti-IL-1β- oder anti-TNFα-Antikörper 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-1β-Präcursor, aber nicht von reifem IL-1β durch rrC5a und LPS in kultivierten Kupfferzellen 95

4.3.2 Fehlender Einfluss von Nichtparenchymzellen und Hepatocyten auf die Prozessierung von Pro-IL-1β in Kupfferzellen 97

4.3.3 Fehlende Freisetzung von reifem IL-1β nach Stimulation mit LPS in der isoliert perfundierten Rattenleber 99

4.3.4 Freisetzung von reifem IL-1β aus isolierten Kupfferzellen von *in vivo* 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-1β und/oder TNFα 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-1β- und TNFα-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

C5a- und/oder LPS-induzierte IL-6-Freisetzung 113

C5a- und/oder LPS-induzierte TNFα-Freisetzung 114

Fehlende Freisetzung von IL-1β durch C5a und/oder LPS in Kupfferzellen 114

C5a- und/oder LPS-induzierte Synthese von IL-1β-Präcursor in Kupfferzellen 115

Freisetzung von reifem IL-1β aus Kupfferzellen LPS-behandelter Ratten 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

Induktion des positiven Typ-2 Akut-Phase-Proteins α_2-Makroglobulin 120

Induktion des positiven Typ-1 Akut-Phase-Proteins Hämopexin 122

Repression des „negativen" Akut-Phase-Proteins Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 123

5.2.3 Expression von Adhäsionsmolekülen in Sinusoidalen Endothelzellen zur Rekrutierung von Leukocyten an den Entzündungsort 123

Direkte Wirkungen von C5a und LPS auf die Expression von Adhäsionsmolekülen 124

Cytokin-vermittelte Wirkungen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen 124

Einfluss einer akuten Leberschädigung auf die Expression von Adhäsionsmolekülen 125

5.3 Fazit 127

LITERATURVERZEICHNIS 128