Einschränkung hepatischer Abwehrreaktionen während einer Entzündung durch Prostaglandin E₂ über G_S-Protein-gekoppelte Prostaglandin E₂-Rezeptoren

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

> Vorgelegt von Alexandra Fennekohl aus Laatzen

> > Göttingen 2001

D 7

Referent:Prof. Dr. Kurt JungermannKorreferent:Prof. Dr. Rüdiger HardelandTag der mündlichen Prüfung:30. Oktober 2001

Inhaltsverzeichnis

	Verzeichnis der Abbildungen	IX
	Verzeichnis der Tabellen	XI
	Verzeichnis der Abkürzungen	XII
	Zusammenfassung	1
1.	Einleitung	3
1.1	Funktionen der Leber	3
1.2	Zelltypen der Leber und ihre spezifischen Funktionen	3
1.3	Die Akutphase-Antwort der Leber	5
1.4	Akutphase-Proteine und inflammatorische Cytokine	6
1.4.1	Akutphase-Proteine	6
1.4.2	Interleukin-6 und die IL-6-Signalkette	6
1.5	Prostanoide und Prostanoidrezeptoren	8
1.5.1	Prostanoid-vermittelte interzelluläre Kommunikation	8
1.5.2	Prostanoidrezeptoren	11
1.6	Ziel der Arbeit	14
2.	Material	15
2.1	Tiere und Tierhaltung	15
2.1.1	Ratten	15
2.1.2	Mäuse	15
2.2	Biochemikalien	15
2.3	Geräte	18
2.4	Verbrauchsmaterialien	21
2.5	Käufliche Reinigungs- und Nachweissysteme	22
2.5.1	Radioimmunoassays und ELISAs	22
2.5.2	Nucleinsäure-Reinigung	22
2.5.3	Chemilumineszenz-Nachweissysteme	22
2.5.4	DNA-Sequenzierung	22
2.6	Enzyme	22
2.6.1	Collagenase H	22
2.6.2	DNase I	23
2.6.3	Pronase E	23
2.6.4	PRO-HA-DNA-Polymerase	23
2.6.5	Reverse Transkriptase RNase H ⁻	24
2.6.6	Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz	24

2.6.7	T4-DNA-Ligase	24
2.7	Molekulare Längenstandards	25
2.7.1	DNA-Längenstandard	25
2.7.2	Protein-Längenstandard	25
2.8	Oligonucleotide	25
2.8.1	"sense"-Oligonucleotide	25
2.8.2	"antisense"-Oligonucleotide	26
2.9	Polyklonale Antikörper	27
2.10	<i>E. coli</i> XL-1 (blue) Bakterien	27
2.11	Vektoren	27
2.11.1	pGEM [®] -T-Vektor	27
2.11.2	pGL3-Basic-Vektor	29
2.11.3	Plasmid pRc/CMV-STAT3	30
3.	Methoden	31
	> Zellbiologische Methoden <	
3.1	Isolierung, Reinigung und Kultivierung von Hepatocyten der Ratte nach Meredith (1988)	31
3.1.1	Puffer und Lösungen	31
3.1.2	Nicht-rezirkulierende <i>in situ</i> -Perfusion der Rattenleber zur Isolierung von Hepatocyten	33
3.1.3	Präparation von Hepatocyten der Ratte	34
3.1.4	Reinigung von Hepatocyten der Ratte durch Dichtegradienten- Zentrifugation	34
3.1.5	Mikroskopische Zellzählung	34
3.1.6	Kultivierung von Hepatocyten der Ratte	35
3.2	Isolierung Reinigung und Kultivierung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	35
3.2.1	Puffer und Lösungen	35
3.2.2	Nicht-rezirkulierende <i>in situ</i> -Perfusion der Rattenleber zur Isolierung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen	38
3.2.3	Rezirkulierende <i>in situ</i> -Perfusion und Inkubation der groben Zellsuspension	38
3.2.4	Reinigung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	38
3.2.5	Trennung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte durch zentrifugale Elutriation	39
3.2.6	Mikroskopische Zellzählung	41
3.2.7	Herstellung Collagen-beschichteter Zellkulturplatten	43
	Herstellung der Collagen-Lösung	43
	Beschichtung der Zellkulturplatten	43
3.2.8	Kultivierung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	43

3.3	Isolierung, Reinigung und Kultivierung von Kupfferzellen der Maus	43
3.3.1	Puffer und Lösungen	43
3.3.2	Nicht-rezirkulierende <i>in situ</i> -Perfusion der Mausleber und Inkubation der groben Zellsuspension	45
3.3.3	Reinigung von Kupfferzellen der Maus durch einen zweistufigen Nycodenz-Dichtegradienten	46
3.3.4	Mikroskopische Zellzählung	46
3.3.5	Kultivierung von Kupfferzellen der Maus	46
3.4	Isolierung, Reinigung und Kultivierung von Perisinusoidalzellen der Ratte	47
3.4.1	Puffer und Lösungen	47
3.4.2	Nicht-rezirkulierende <i>in situ</i> -Perfusion der Rattenleber und Inkubation der groben Zellsuspension	48
3.4.3	Reinigung von Perisinusoidalzellen der Ratte	49
3.4.4	Mikroskopische Zellzählung	50
3.4.5	Kultivierung von Perisinusoidalzellen der Ratte	50
3.5	Zellkulturversuche	50
3.5.1	Puffer und Lösungen	50
3.5.2	Zellkulturversuche zum funktionellen Nachweis G _S - und G _i -Protein- gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Nichtparenchymzellen	50
3.5.3	Zellkulturversuche zur Induktion der mRNA-Expression und zum funktionellen Nachweis G _S -Protein-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten der Ratte durch II -6	53
	Zeitabhängigkeit	54
	Dosiswirkung	54
	Funktioneller Nachweis des EP3-R in II -6-behandelten Henatocyten	55
	Funktioneller Nachweis der Induktion G _S -gekoppelter Prostaglandin- rezeptoren in Hepatocyten IL-6-behandelter Ratten	55
3.5.4	Zellkulturversuche zur Regulation der Expression der mRNA von α_2 -Makroglobulin und der Sekretion des α_2 -Makroglobulin-Proteins in	
	Hepatocyten der Ratte	55
	Nachweis der α_2 -Makroglobulin-mRNA in Hepatocyten	55
	Nachweis des α_2 -Makroglobulins in Zellkulturüberständen von Hepatocyten	56
3.5.5	Zellkulturversuche zum immunologischen Nachweis der Phosphorylierung von STAT3 in Kernfraktionen und Jak1 in Zellysaten von Hepatocyten der Ratte	56
3.5.6	Zellkulturversuche zum Nachweis der Modulation der TNF α -Freisetzung aus Maus-Kupfferzellen durch PGE ₂	57
	Dosiswirkung der Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung durch PGE2 in Kupfferzellen der Maus	57
	Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung aus Kontroll-Kupfferzellen sowie aus Kupfferzellen EP2-R- und EP-4-R-defizienter Mäuse	57

	Zeitabhängigkeit der Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung durch PGE ₂ in Kupfferzellen der Maus	57
	> Biochemische Methoden <	
3.6	Radioimmunologische Bestimmung von cyclischem Adenosin-3',5'- monophosphat (cAMP)	58
3.6.1	Prinzip	58
3.6.2	Puffer und Lösungen	58
3.6.3	Durchführung des cAMP-Radioimmunoassays	59
3.6.4	Auswertung des cAMP-Radioimmunoassays	60
3.7	Radioimmunologische Bestimmung von PGE2 in Zellkultur- überständen von Kupfferzellen der Maus	61
3.7.1	Prinzip	61
3.7.2	Puffer und Lösungen	6′
3.7.3	Durchführung des PGE2-Radioimmunoassays	62
3.7.4	Auswertung des PGE2-Radioimmunoassays	63
3.8	Bestimmung von TNF α in Zellkulturüberständen durch ELISA	
	(<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay)	63
3.8.1	Prinzip	63
3.8.2	Puffer und Lösungen	64
3.8.3	Durchführung des TNF α -ELISAs	65
	Herstellung der TNF α -Standard-Stammlösung und der Standardreihe	65
	Durchführung des ELISAs	65
3.9	Proteinbestimmung nach Bradford <i>et al.</i> (1976)	66
3.9.1	Puffer und Lösungen	66
3.9.2	Proteinbestimmung	66
3.10	Immunologischer Nachweis des α2-Makroglobulin-Proteins sowie des phosphorylierten STAT3- und Jak1-Proteins aus Hepatocyten durch Westernblot-Analyse	67
3.10.1	Puffer und Lösungen	67
3.10.2	Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	69
3.10.3	Vorbereitung der Gele für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	69
3.10.4	Trennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	7(
3.10.5	Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membranen durch Elektroblotting (Westernblot)	7'
3.10.6	Reversible Ponceau S-Färbung	7′
3.10.7	Immunologischer Nachweis der Proteine in der Westernblot-Analyse durch eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion	72
	> Molekularbiologische Methoden <	
3.11	Isolierung von Gesamt-RNA	73
3.11.1	Prinzip	73

3.11.2	Puffer und Lösungen	73
3.11.3	Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Total RNA-Kits der Firma Qiagen	73
3.12	Semiquantitative RT-PCR	74
3.12.1	Prinzip	74
3.12.2	Puffer und Lösungen	75
3.12.3	Synthese von cDNA-mRNA-Hybriden	76
3.12.4	PCR-Protokolle	76
3.13	Agarosegel-Elektrophorese	77
3.13.1	Puffer und Lösungen	77
3.13.2	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	78
3.14	Klonierung eines α_2 -Makroglobulinpromotor-Konstruktes der Ratte	79
3.14.1	Isolierung genomischer DNA aus Hepatocyten der Ratte mit Hilfe des DNeasy DNA-Kits der Firma Qiagen	79
	Prinzip	79
	Puffer und Lösungen	79
	Isolierung genomischer DNA aus Hepatocyten der Ratte	80
3.14.2	PCR mit genomischer DNA aus Hepatocyten der Ratte	80
	Puffer und Lösungen	80
	PCR	81
3.14.3	Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem Jetsorb-Kit der Firma Genomed	81
	Puffer und Lösungen	81
	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	81
3.14.4	Quantitative Bestimmung der DNA-Extraktion	82
3.14.5	Klonierung eines PCR-Produktes in das Plasmid pGEM $^{\mathbb{R}}$ -T	82
	Puffer und Lösungen	83
	Ligation des PCR-Produktes und des $pGEM^{\textcircled{R}}$ -T –Vektors	83
3.15	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> XL-1 (blue) Zellen für die Elektroporation	83
3.15.1	Puffer und Lösungen	83
3.15.2	Vorbereitung der <i>E. coli</i> XL-1 (blue) Zellen	84
3.16	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> XL-1 (blue) Zellen durch Elektroporation	84
3.16.1	Puffer und Lösungen	84
3.16.2	Transformation durch Elektroporation	85
3.17	Analyse rekombinanter Bakterienkolonien durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab	86
3.17.1	Prinzip	86
3.17.2	Puffer und Lösungen	87
3.17.3	Reinigung der Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie im Mini- Maßstab	87

3.17.4	Photometrische Quantifizierung der gereinigten Plasmid-DNA	88
3.17.5	Spezifische Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen zum	
	Nachweis der erfolgreichen Klonierung	88
	Putter und Losungen	. 88 88
3 18	Klonierung des Promotorfragmentes in pGL 3-Basic	88
3 18 1	Puffer und Lösungen	88
2 10 2	Funer and Losungen.	. 00
3.10.Z	Ligation dos Promotorfragmentos und dos Vektors nCL 2 Pasio	09
3.10.3 2.40	Ligation des Promotornagmentes und des Vektors pGLS-Basic	09
3.19	Isolierung der Plasmid-DNA pGL3-dZMG1500 im Maxi-Maisstab	89
3.19.1		. 89
3.19.2	Puffer und Losungen	90
3.19.3	Isolierung der Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie	90
3.20	Sequenzierung des Promotorkonstruktes pGL3-α2MG1500 mit dem Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenzer	. 91
3.20.1	Prinzip	. 91
3.20.2	Puffer und Lösungen	. 92
3.20.3	Sequenzierungsreaktion	. 93
3.20.4	Aufarbeitung der Sequenzierproben	. 93
3.21	Transfektion von Ratten-Hepatocyten der Ratte nach der Calcium- Phosphat-Methode	. 94
3.21.1	Prinzip	. 94
3.21.2	Puffer und Lösungen	. 94
3.21.3	Transfektion von Hepatocyten nach der Calcium-Phosphat-Methode	95
3.22.	Nachweis der Luciferase-Reportergen-Aktivität	95
3.22.1	Prinzip	. 95
3.22.2	Puffer und Lösungen	. 96
3.22.3	Durchführung des Luciferase-Assays	. 96
4.	Ergebnisse	. 98
4.1	Expression G _S - und G _i -gekoppelter Prostanoidrezeptoren in Nichtparenchymzellen der Rattenleber	. 98
4.1.1	Expression der mRNA von G _S - und Gi-gekoppelten Prostanoidrezeptoren in 72 h kultivierten Kupfferzellen der Ratte	. 99
4.1.2	Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in 72 h kultivierten Kupfferzellen der Ratte	. 100
4.1.3	Expression der mRNA von G _S - und Gj-gekoppelten Prostanoidrezeptoren in 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	104
4.1.4	Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	. 105
4.1.5	Expression der mRNA von G _S - und G _i -gekoppelten Prostanoidrezeptoren in 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte	. 107

4.1.6	Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte	108
4.2	Inhibition der LPS-stimulierten TNFα-Freisetzung durch PGE ₂ in Kupfferzellen EP2-R- oder EP4-R-defizienter Mäuse	111
4.2.1	Expression der mRNA der G _s -gekoppelten PGE ₂ -Rezeptoren EP2-R und EP4-R in 72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen	111
4.2.2	Inhibition der LPS-induzierten TNFα-Bildung in 72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R- defizienten Mäusen	113
4.2.3	Dosiswirkung der Inhibition der LPS-induzierten TNF α -Bildung durch PGE ₂ in 72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R- defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen	115
4.2.4	Zeitabhängigkeit der LPS-induzierten TNFα-Bildung und deren Inhibition durch PGE ₂ in 72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontroll- mäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen	116
4.3	Induktion G _S -gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in Hepatocyten	440
4.3.1	Zeitabhängigkeit der IL-6-induzierten Expression G _S -gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte	118
4.3.2	Dosiswirkung der IL-6-induzierten Expression G _S -gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte	120
4.3.3	Verstärkung der PGE2-vermittelten cAMP-Bildung in IL-6-behandelten kultivierten Hepatocyten durch Pertussistoxin	122
4.3.4	Induktion G _S -gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in Hepatocyten der Ratte <i>in vivo</i>	124
4.4	Hemmung der IL-6-stimulierten Expression und Sekretion des Akutphase-Proteins α2-Makroglobulin durch PGE2 über eine Beeinträchtigung der α2-Makroglobulin-Promotoraktivität in	405
4.4.1	Inhibition der IL-6-stimulierten α_2 -Makroglobulin-mRNA-Expression und α_2 -Makroglobulin-Sekretion durch PGE ₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte	125
4.4.2	Hemmung der IL-6-stimulierten transkriptionellen Aktivität des α_2 -Makroglobulin-Promotors durch PGE2 in kultivierten Hepatocyten der Ratte	128
4.4.3	Verzögerte Hemmung der IL-6-stimulierten Phosphorylierung von STAT3 aber nicht Jak1 durch PGE2 in kultivierten Hepatocyten der Ratte	129
5.	Diskussion	132
5.1	Bedeutung konstitutiv exprimierter Prostanoidrezeptoren auf Nichtparenchymzellen der Rattenleber	132
5.1.1	Funktionen des EP2-R und EP4-R auf Kupfferzellen der Ratte	132
5.1.2	Funktionen des EP4-R auf sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	133
5.1.3	Funktionen des IP-R auf Perisinusoidalzellen der Ratte	134
5.2	Differentielle Bedeutung der beiden G _S -gekoppelten PGE ₂ - Rezeptoren EP2-R und EP4-R in Kupfferzellen der Maus	136

5.3	Bedeutung der induzierbaren G _S -gekoppelten Prostanoid- rezeptoren in Hepatocyten der Rattenleber	138
5.3.1	Bedeutung der Induktion G _S -gekoppelter PGE ₂ -Rezeptoren durch IL-6 in Hepatocyten der Ratte	138
5.3.2	Bedeutung der Induktion des G _S -gekoppelten PGD ₂ -Rezeptors durch IL-6 in Hepatocyten der Ratte	139
5.3.3	Die Rolle von PGE ₂ während der akuten und subakuten Phase der Entzündung in der Leber	140
5.3.4	Mechanismus der PGE2-abhängigen Hemmung der IL-6-induzierten α_2 -Makroglobulin-Synthese	141
5.4	Modell der Prostanoid-Wirkungen in der Leber während einer Entzündung	143
	Literaturverzeichnis	145

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Lebergewebes	4
Abb. 2:	Signalweg der IL-6-abhängigen transkriptionellen Aktivierung des Akutphase-Protein-Gens α_2 -Makroglobulin	7
Abb. 3:	Prostanoid-Synthese	10
Abb. 4:	Restriktionskarte des Vektors pGEM $^{\ensuremath{\mathbb{R}}}$ -T	28
Abb. 5:	Restriktionskarte des Vektors pGL3-Basic	28
Abb. 6:	Restriktionskarte des Vektors pRc/CMV	29
Abb. 7:	Verhalten von Zellen in der Standard-Trennkammer während der zentrifugalen Elutriation	40
Abb. 8:	Schematische Darstellung des Elutriatorsystems	42
Abb. 9:	Schematischer Aufbau eines Westernblots (Elektroblotting)	70
Abb. 10:	Expression der G _S -gekoppelten Prostanoidrezeptoren DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R aber nicht des G _j -gekoppelten EP3-R in kultivierten Nichtparenchymzellen der Ratte	98
Abb. 11:	Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in kultivierten Kupfferzellen der Ratte	100
Abb. 12:	EP2-Rezeptor- und EP4-Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in kultivierten Kupfferzellen der Ratte	101
Abb. 13:	PGE ₂ -abhängige cAMP-Bildung in kultivierten Kupfferzellen der Ratte	103
Abb. 14:	Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	104
Abb. 15:	EP2-Rezeptor- und EP4-Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	105
Abb. 16:	PGE ₂ -abhängige cAMP-Bildung in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte	106
Abb. 17:	Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte	108
Abb. 18:	EP2-Rezeptor- und EP4-Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte	109
Abb. 19:	PGE2-abhängige cAMP-Bildung in kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte	110
Abb. 20:	Expression der G _S -gekoppelten PGE ₂ -Rezeptoren EP2-R und EP4-R in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen	112
Abb. 21:	Inhibition der LPS-induzierten TNFα-Bildung in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R- defizienten Mäusen	113
Abb. 22:	Dosiswirkung der Inhibition der LPS-induzierten TNFα-Bildung durch PGE ₂ in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R- defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen.	116
Abb. 23:	Zeitabhängigkeit der LPS-induzierten TNFα-Bildung und deren Inhibition durch PGE ₂ in kultivierten Kupfferzellen aus Kontroll- mäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen	117

Abb. 24:	Zeitabhängigkeit der Induktion der mRNAs G _S -gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6	119
Abb. 25:	Funktioneller Nachweis des Zeitverlaufs der Induktion G _S - gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6	120
Abb. 26:	Dosiswirkung der Induktion der mRNAs G _S -gekoppelter Prostaglandin- rezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6	121
Abb. 27:	Funktioneller Nachweis der dosisabhängigen Induktion G _S - gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6	122
Abb. 28:	Verstärkung der PGE2-vermittelten cAMP-Bildung in IL-6-behandelten kultivierten Hepatocyten der Ratte durch Pertussistoxin (PTX)	123
Abb. 29:	Funktioneller Nachweis für die Induktion G _S -gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in Hepatocyten der Ratte <i>in vivo</i>	124
Abb. 30:	Inhibition der IL-6-induzierten Expression der α_2 -Makroglobulin-mRNA durch PGE ₂ über G _S -gekoppelte PGE ₂ -Rezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte	126
Abb. 31:	Inhibition der IL-6-induzierten Sekretion des α_2 -Makroglobulin-Proteins durch PGE ₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte	127
Abb. 32:	Inhibition der IL-6-stimulierten transkriptionellen Aktivierung des α_2 -Makroglobulin-Promotors durch PGE ₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte	128
Abb. 33:	Verzögerte Hemmung der IL-6-stimulierten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch PGE2 in kultivierten Hepatocyten der Ratte	120
Abb. 34:	Fehlender Einfluß von PGE ₂ auf die IL-6-stimulierte Phosphorylierung der Janus-Kinase Jak1 in kultivierten Hepatocyten der Ratte	129
Abb. 35:	Mögliche Funktionen der funktionell und auf mRNA-Ebene nach- gewiesenen G _S -gekoppelten Prostanoidrezeptoren auf Nichtparenchymzellen der Rattenleber	135
Abb. 36:	PGE ₂ -vermittelte Hemmung der IL-6-stimulierten Synthese von Akutphase-Proteinen über die durch IL-6-induzierten G _S -gekoppelten PGE ₂ -Rezeptoren EP2-R und EP4-R	142

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Einteilung der Prostanoidrezeptoren	11
Tab. 2:	Differentielle Expression der Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten (HC), Kupfferzellen (KC), sinusoidalen Endothelzellen (SEC) und Perisinusoidalzellen (PSC) der Rattenleber	12
Tab. 2a:	Vergleich der Expression G _S - und G _i -gekoppelter Prostanoid- rezeptoren in frisch isolierten und kultivierten Nichtparenchymzellen der Rattenleber	99
Tab. 3:	Primersequenzen	26
Tab. 4:	Elutriationsschema	41
Tab. 5:	Tabellarische Darstellung der Durchführung des cAMP- Radioimmunoassays	60
Tab. 6:	Tabellarische Darstellung der Durchführung des PGE ₂ - Radioimmunoassays	63
Tab. 7:	Endogene PGE ₂ -Produktion in Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen nach 6 h Stimulation mit LPS	114
Tab. 8:	Bindungsaffinitäten des EP2-R-spezifischen Agonisten ONO613 und des EP4-R-spezifischen Agonisten ONO604 für die in CHO-Zellen exprimierten angegeben PGE ₂ -Rezeptoren	115
Tab. 9:	Einschränkung eventuell überschießender Abwehrfunktionen der Leber über die G _S -gekoppelten Prostanoidrezeptoren EP2-R, EP4-R und IP-R auf Kupfferzellen (KC), sinusoidalen Endothelzellen (SEC), Perisinusoidalzellen (PSC) und Hepatocyten (HC) der Leber während einer Entzündung.	144
	-	

Verzeichnis der Abkürzungen

α ₂ -MG	α_2 -Makroglobulin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
APRE	Acute Phase Response Element (Akutphase-responsives Element)
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DP-R	Prostaglandin D ₂ -Rezeptor (<u>D</u> -Prostaglandin- <u>R</u> ezeptor)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
EP1-R	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor Subtyp 1 (<u>E</u> - <u>P</u> rostaglandin- <u>R</u> ezeptor)
EP2-R	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor Subtyp 2 (<u>E</u> - <u>P</u> rostaglandin- <u>R</u> ezeptor)
EP3-R	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor Subtyp 3 (<u>E</u> - <u>P</u> rostaglandin- <u>R</u> ezeptor)
EP4-R	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor Subtyp 4 (<u>E</u> - <u>P</u> rostaglandin- <u>R</u> ezeptor)
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FP-Rezeptor	Prostaglandin F _{2α} -Rezeptor (<u>F</u> -Prostaglandin- <u>R</u> ezeptor)
Gp130	Glykoprotein 130
G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
HC	Hepatocyt
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HMW-Standard	High Molecular Weight-Standard
HEPES	2-(4-/2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-Ethansulfonat
IBMX	IsobutyImethyIxanthin
lgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1

IL-6	Interleukin-6
IL-11	Interleukin-11
InsP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP-R	$\label{eq:Prostacyclin} Prostacyclin \ (Prostaglandin \ I_2)-Rezeptor \ (\underline{I}-\underline{P}rostanoid-\underline{R}ezeptor)$
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
Jak	Janus-Kinase
kb	Kilobasenpaare
KC	Kupfferzelle
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
mAK	monoklonaler Antikörper
NCS	Newborn Calf Serum (Neonatales Kälberserum)
Od _{x nm}	Optische Dichte (Absorption) bei einer Wellenlänge von x nm
PBS	Phosphate-buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin F $_{2\alpha}$
PGI ₂	Prostacyclin
PSC	Perisinusoidalzelle
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIA	Radio-linked Immunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
Rp-cAMPS	Rp-Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphorothioat
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SEC	Sinusoidale Endothelzelle
SH2	Src-Homologie-Domäne 2
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SDS	Sodium Dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Stlsg	Stammlösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered Salt Solution
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
ТМВ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
ΤΝFα	Tumor-Nekrose-Faktor α

TP-R	Thromboxan A ₂ -Rezeptor (<u>T-P</u> rostanoid- <u>R</u> ezeptor)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
Tyk	Tyrosin-Kinase (Janus-Kinase)
U	Unit [µmol/min], internationale Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

Zusammenfassung

Ausgangsbefunde und Aufgabenstellung: Die Akutphase-Antwort ist eine komplexe Reaktion auf Verletzungen und Infektionen. Sie wird initiiert und aufrechterhalten durch Cytokine, wie z. B. TNF α (Tumor Nekrose Faktor α) und IL-6 (Interleukin-6). Diese Cytokine werden u. a. in großen Mengen lokal in der Leber durch die dort residenten Makrophagen, die Kupfferzellen produziert. Kupfferzellen setzen neben Cytokinen auch Prostanoide frei, die an der Modulation der Akutphase-Antwort beteiligt sind. Prostanoide vermitteln ihre Effekte auf die Zielzellen über heptahelikale Transmembran-Rezeptoren. Für die Prostanoide Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF_{2\alpha}), Prostaglandin D₂ (PGD₂), Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan (TXA₂) existieren jeweils ein spezifischer Prostanoidrezeptor FP-R, DP-R, IP-R bzw. TP-R, die an folgende G-Proteine koppeln: Gg, Gs, Gs bzw. Gg. Für PGE2 konnten vier verschiedene Rezeptorsubtypen kloniert werden: der EP1-R koppelt an Gq und steigert die Synthese von Inositoltrisphosphat und Ca²⁺. Der EP3-R ist als einziger Prostanoidrezeptor an ein Gi-Protein gekoppelt und hemmt eine Hormon-stimulierte Bildung von cAMP, während sowohl der EP2-R als auch der EP4-R an Gs-Proteine koppeln und so einen PGE2abhängigen cAMP-Anstieg in der Zelle vermitteln. Die mRNAs der acht Prostanoidrezeptoren werden differentiell frisch isolierten Parenchymzellen in (Hepatocyten) und Nichtparenchymzellen (Kupfferzellen, sinusoidale Endothelzellen und Perisinusoidalzellen) der Leber exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression G_S- und G_i-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Nichtparenchymzellen, sowie die Regulation der Expression und die Beteiligung einzelner Rezeptorsubtypen in verschiedenen Signalketten während entzündlicher Prozesse in der Leber untersucht werden.

Expression G_S - und G_i -gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Parenchymzellen und Nichtparenchymzellen der Leber: Hepatocyten exprimieren auf mRNA-Ebene konstitutiv keinen der G_S -gekoppelten Prostanoidrezeptoren. IL-6 konnte jedoch die Expression des EP2-R, EP4-R und DP-R, aber nicht des IP-R innerhalb von 2 h induzieren. In Kupfferzellen der Ratte und der Maus konnten sowohl auf mRNA-Ebene als auch funktionell durch Rezeptorsubtyp-spezifische Liganden der EP2-R und der EP4-R nachgewiesen werden, während in sinusoidalen Endothelzellen nur der EP4-R und in Perisinusoidalzellen nur der EP2-R nachweisbar waren. Der IP-R war funktionell und auf mRNA-Ebene nur in Perisinusoidalzellen zu finden. Der EP3-R dagegen konnte gleichzeitig funktionell und auf mRNA-Ebene nur in Hepatocyten nachgewiesen werden.

Funktion der konstitutiv exprimierten G_S -gekoppelten EP2-R und EP4-R in Kupfferzellen: PGE₂, das von Kupfferzellen als Antwort auf proinflammatorische Stimuli wie z. B. LPS (Lipopolysaccharid) freigesetzt wird, inhibiert die LPS-induzierte Synthese von TNF α in einer autokrinen Rückkopplungsschleife über einen intrazellulären cAMP-Anstieg. Um aufzuklären, welcher der beiden auf Kupfferzellen exprimierten PGE₂-Rezeptoren diese Wirkung vermittelt, wurde die PGE₂-abhängige Modulation der TNF α -Bildung in Kupfferzellen aus Mäusen untersucht, denen der EP2-R oder EP4-R fehlten. Die Ergebnisse zeigten, daß PGE₂ sowohl über den EP2-R als auch über den EP4-R die LPS-stimulierte TNF α -Freisetzung inhibieren konnte, daß aber PGE₂ in niedrigen Konzentrationen eher über den EP4-R wirkte. Für eine vollständige Inhibition der TNFα-Bildung war jedoch die parallele Wirkung beider Prostanoidrezeptoren notwendig.

*Funktion des G*_S-gekoppelten EP4-R in sinusoidalen Endothelzellen: Sinusoidale Endothelzellen gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen. PGE₂, das die Antigenpräsentation durch sinusoidale Endothelzellen reduziert, könnte seine Wirkung über den G_S-gekoppelten EP4-R vermitteln.

Funktion des G_S-gekoppelten IP-R in Perisinusoidalzellen: Endothelin kann über einen intrazellulären Anstieg von Inositoltrisphosphat und Ca²⁺ eine Kontraktion von Perisinusoidalzellen auslösen. Diese Endothelin-vermittelte Kontraktion könnte durch die Wirkung von Prostacyclin auf den IP-R antagonisiert werden.

Funktion der induzierbaren G_S -gekoppelten EP2-R und EP4-R in Hepatocyten: Durch die Induktion des EP2-R und EP4-R konnte PGE₂ in Hepatocyten in einer cAMP-abhängigen Signalkette die IL-6-stimulierte Bildung des Haupt-Akutphase-Proteins der Ratte, des α_2 -Makroglobulin, hemmen.

Mechanismus der IL-6-inhibitorischen Wirkung des EP2-R und EP4-R: PGE₂ konnte über die durch IL-6-induzierten EP2-R und EP4-R negativ in die intrazelluläre IL-6-Signalkaskade eingreifen, indem es cAMP-vermittelt die transkriptionelle Aktivierung des α_2 -Makroglobulin-Gens durch eine Verringerung der Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 inhibierte.

Modell der PGE_2 -Wirkung über G_S -gekoppelte PGE_2 -Rezeptoren während der Entzündung: Durch das Schlüsselcytokin der Akutphase-Antwort IL-6 werden im Verlauf einer Entzündung auf Hepatocyten die G_S -gekoppelten EP2-R und EP4-R exprimiert, über die PGE_2 die Synthese von positiven Akutphase-Proteinen hemmen und damit ein Überschießen der Akutphase-Antwort verhindern kann. Auch kann über die konstitutiv auf Kupfferzellen exprimierten EP2-R und EP4-R die Produktion von Entzündungsmediatoren wie TNF α in Kupfferzellen beschränkt werden. Somit kann PGE_2 als antiinflammatorischer Mediator im hepatischen Sinusoid die evtl. überschießenden Verteidigungsmechanismen während der Akutphase-Antwort einschränkend modulieren.

1. Einleitung

1.1 Funktionen der Leber

Die Leber übernimmt zahlreiche Funktionen im Organismus; sie stellt das Energiestoffwechselzentrum dar, indem sie den Glucose- und Aminosäurehaushalt reguliert, Lipide prozessiert und Ketonkörper im Falle einer anhaltenden Nahrungskarenz synthetisiert. Außerdem ist die Leber neben der Milz ein wichtiger Blutspeicher und an der Entsorgung Stickstoff-haltiger Produkte durch die Harnstoffbildung beteiligt. Sie synthetisiert und sezerniert Gallensäuren für den Verdauungsprozeß und spielt eine wichtige Rolle im Hormonhaushalt des Organismus, da sie (Pro-)Hormone und Mediatoren synthetisiert, sie aber auch abbaut. Die Leber ist der Hauptsyntheseort der Plasmaproteine und produziert für die Bildung und Aufrechterhaltung der eigenen Organstruktur zelluläre und extrazelluläre (Biomatrix-)Bestandteile (Jungermann und Kietzmann 1996).

Schließlich hat sie auch Aufgaben bei der chemischen Abwehr und der Immunabwehr. Neben Nährstoffen gelangen über die Pfortader auch Xenobiotika, Pathogene und Toxine aus dem Darm zur Leber. Diese werden durch Biotransformation entgiftet bzw. durch Phagocytose eliminiert. Bei Entzündungen der Leber oder anderer Organe werden leberspezifische Funktionen im Rahmen der Akutphase aktiviert: die Freisetzung von Glucose wird verstärkt und die Synthese von Plasmaproteinen wird in ihrem Profil umgestellt (positive und negative Akutphase-Proteine) (Jungermann und Kietzmann 1996).

Diese Vielzahl wichtiger Aufgaben werden von den verschiedenen hepatischen Zelltypen übernommen.

1.2 Zelltypen der Leber und ihre spezifischen Funktionen

Das Lebergewebe besteht aus den Parenchymzellen (Hepatocyten) und den Nichtparenchymzellen (Abb. 1). Zu den Nichtparenchymzellen, die 10% der Zellmasse und 40% der Zellzahl in der Leber ausmachen, gehören mindestens vier unterschiedliche Zelltypen: Kupfferzellen, sinusoidale Endothelzellen, Perisinusoidalzellen (perisinusoidale Fettspeicherzellen, Stern- oder auch Itozellen) und Pitzellen (große, granuläre Lymphocyten oder Natural Killer Cells). Zu den 40% der Zellzahl tragen mit 70% die sinusoidalen Endothelzellen, mit 20% die Kupfferzellen, mit 10% die Perisinusoidalzellen und mit weniger als 1% die Pitzellen bei (Knook und Sleyster 1980; Knook *et al.* 1977; Wisse *et al.* 1976).



Abb. 1: Schematische Darstellung des Lebergewebes. Das Parenchym besteht aus Leberzellplatten, die aus benachbarten Hepatocyten (H) gebildet werden. Das Blut fließt durch die Sinusoide (S), die von den fenestrierten Endothelzellen (E) gebildet werden, die ihrerseits von Perisinusoidalzellen (perisinusoidalen Fettspeicherzellen oder Itozellen) (F) umgeben werden. Kupfferzellen (K) und Pitzellen (große, granuläre Lymphocyten oder Natural Killer Cells) (P) ragen in das sinusoidale Lumen hinein. Zwischen der endothelialen Zellauskleidung und den Hepatocyten befindet sich der Disse'sche Raum (SD), in dem extrazelluläre Matrix lokalisiert ist. Mit ihrer apikalen Membran bilden die Hepatocyten die Gallencanaliculi (BC). Nach Sasse D., Spornitz U.M. und Maly I.P. (1992).

Die Kupfferzellen sitzen an der endothelialen Wand des Sinusoids und machen mit über 80% das größte Reservoir an Makrophagen im Körper aus. Durch Antigenpräsentation und Phagocytose makromolekularer Fremdstoffe (Roitt *et al.* 1996), aber auch durch die Synthese und Freisetzung von Prostanoiden, Sauerstoffradikalen und Cytokinen unterstützen sie die lokale Abwehr (Grewe *et al.* 1992; Busam *et al.* 1990; Bhatnagar *et al.* 1981). Die Anzahl und Größe der Kupfferzellen ist in der periportalen Region größer als in der perivenösen (Bouwens *et al.* 1986). Ihre physiologische Hauptfunktion ist die Elimination von LPS (Lipopolysaccharid), einem Zellwandbestandteil von (Darm-)Bakterien, das normalerweise nur in sehr geringen Mengen, bei z. B. Darmerkrankungen jedoch in größeren Mengen, mit dem Pfortaderblut aus dem Darm zur Leber gelangt (Roitt *et al.* 1996).

Die sinusoidalen Endothelzellen besitzen im Gegensatz zu vaskulären Endothelzellen Fenestrae und bilden die Wände der Sinusoide. Die Fenestrae erlauben einen freien Zugang für Makromoleküle zur Oberfläche der Hepatocyten, halten jedoch zelluläre Komponenten im Lumen der Sinusoide zurück. Die sinusoidalen Endothelzellen gehören zu den Antigenpräsentierenden Zellen; sie sind durch Phagocytose am Abbau von Makromolekülen wie Toxinen und Mikroorganismen und an der Adhäsion und Transmigration von Immunzellen beteiligt (Knolle und Gerken 2000; Dini *et al.* 1995; Burt *et al.* 1993; Van Berkel *et al.* 1991; Magnusson und Berg 1989). Die sinusoidalen Endothelzellen bilden zusammen mit den Kupfferzellen das retikuloendotheliale System der Leber.

Die Perisinusoidalzellen speichern Vitamin A oder Retinol in Lipidtröpfchen (Hendriks *et al.* 1985). Sie umschließen die sinusoidale Auskleidung und besitzen kontraktile Elemente, weshalb ihre Beteiligung bei der Regulation des sinusoidalen Blutflusses diskutiert wird (Oda *et al.* 1993; Kawada *et al.* 1993). Sie synthetisieren und sezernieren extrazelluläre Matrixkomponenten (Bouwens *et al.* 1992) und sind an der Pathogenese der Fibrose und Cirrhose beteiligt (Ramadori *et al.* 1993; Gressner 1991).

Große granuläre Lymphocyten, die sogenannten Pitzellen oder Leber-assoziierte Lymphocyten, sind natürliche Killerzellen, die lose an der luminalen Oberfläche des Sinusoids, den Kupffer- oder sinusoidalen Endothelzellen angeheftet sind (Burt *et al.* 1993). Ihre Hauptfunktion ist die Abtötung bestimmter Tumorzellen des Darms (Bouwens *et al.* 1992).

Die Parenchymzellen (Hepatocyten) machen ca. 90% der Zellmasse der Leber aus, stellen jedoch nur 60% der Zellzahl (Sasse 1992; Blouin *et al.* 1977). Ihre wichtigsten Funktionen sind der Metabolismus von Kohlenhydraten (Jungermann und Kietzmann 1996; Jungermann und Thurman 1992), Aminosäuren und Ammoniak (Jungermann und Kietzmann 1996; Häussinger *et al.* 1992), die Biotransformation von Xenobiotika (Jungermann und Kietzmann 1996; Anundi *et al.* 1993; Misra *et al.* 1992; Thurman *et al.* 1986) und die Synthese von Plasmaproteinen im Rahmen der Akutphase-Antwort (Jungermann und Kietzmann 1996).

1.3 Die Akutphase-Antwort der Leber

Die physiologische Homöostase des Organismus kann durch Infektionen oder Verletzungen gestört werden. Die komplexen Verteidigungsreaktionen, die ausgelöst werden, um das gestörte Gleichgewicht des Körpers wiederherzustellen, werden als Akutphase-Reaktion einer Entzündung bezeichnet. Die Akutphase-Reaktion ist normalerweise transienter Natur, kann aber bei chronischen Erkrankungen von Dauer sein. Die Akutphase-Antwort besteht aus lokalen und systemischen Reaktionen (Heinrich *et al.* 1990; Gordon und Koj 1985; Kushner 1982). Die lokalen Reaktionen sind charakterisiert durch die Aktivierung von Monocyten, Makrophagen, Granulocyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Diese aktivierten Zellen produzieren niedermolekulare Mediatoren und Cytokine, die ihre Wirkung lokal ausüben oder über den Blutstrom zur Peripherie zirkulieren und so eine systemische Reaktion des Körpers hervorrufen.

In der Leber sind es vor allem die dort residenten Makrophagen, die Kupfferzellen, die auf verschiedene physiologische und pathophysiologische Stimuli hin niedermolekulare Cytokine freisetzen. Vor allem LPS (Lipopolysaccharid), Mediatoren und ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, löst die Synthese und Freisetzung von Mediatoren wie z. B. Prostanoiden, NO oder reaktiven Sauerstoffspezies, und von Cytokinen wie IL-1, TNF α und IL-6 aus. Ein sehr komplexer Verbund von Verteidigungsreaktionen wird initiiert, der charakterisiert ist durch Fieber, Schmerzen, einer ansteigenden Produktion und Differenzierung von Zellen aus dem Knochenmark, einer Aktivierung des Immunsystems und im Falle der Leber durch eine Änderung des Syntheseprofils von Plasmaproteinen, den sog. Akutphase-Proteinen durch die Hepatocyten. Es kommt zu einer verstärkten Synthese von positiven Akutphase-Proteinen (z. B. a2-Makroglobulin) und einer verminderten Synthese von negativen Akutphase-Proteinen (z. B. Albumin).

1.4 Akutphase-Proteine und inflammatorische Cytokine

1.4.1 Akutphase-Proteine

Akutphase-Proteine werden ausschließlich in der Leber durch die Hepatocyten synthetisiert. Sie werden in zwei Klassen unterteilt. Typ I Akutphase-Proteine (C-reaktives Protein, α_1 -saures Glycoprotein, Komplementfaktor C3, Serumamyloid A, Haptoglobin, Hämopexin) werden durch IL-1-ähnliche Cytokine (IL-1 α , IL-1 β und TNF α), IL-6 und Kombinationen beider Cytokine induziert, während Typ II Akutphase-Proteine (α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antichymotrypsin, Fibrinogen) durch IL-6-ähnliche Cytokine (z. B. IL-6 oder IL-11) und Glucocorticoide induziert werden (Moshage 1997). Es gibt einen Spezies-abhängigen quantitativen und qualitativen Unterschied in der Stimulation der Expression positiver Akutphase-Protein-Gene. In der Ratte ist α_2 -Makroglobulin das vorherrschende positive Akutphase-Protein, im Menschen dagegen das C-reaktive Protein zusammen mit Serumamyloid A. Akutphase-Proteine spielen eine wichtige Rolle als Regulatoren von proteolytischen Prozessen wie Blutkoagulation, Fibrinolyse und Komplement-Aktivierung, wodurch das Ausmaß der Gewebsschädigung minimiert wird. Eine weitere Funktion haben sie außerdem als Transportproteine im Blut.

1.4.2 Interleukin-6 und die IL-6-Signalkette

IL-6 ist ein multifunktionelles Cytokin, das beteiligt ist an der Hämatopoese, der Differenzierung von Nervenzellen und an der Differenzierung und Proliferation von T-Zellen (Akira *et al.* 1993). Als Antwort auf IL-6 differenzieren B-Zellen zu Antikörpersynthetisierenden und -freisetzenden Plasmazellen. IL-6 ist ein Wachstumsfaktor für

Keratinocyten, Myelom- und Mesangialzellen. Auf der anderen Seite wird das Wachstum von Brustcarcinomen und Melanomzellen durch IL-6 inhibiert. IL-6 wirkt auf Hepatocyten der Leber und induziert dort die Synthese von Akutphase-Proteinen (Heinrich *et al.* 1990; Andus *et al.* 1987; Gauldie *et al.* 1987).



Abb. 2: Signalweg der IL-6-abhängigen transkriptionellen Aktivierung des Akutphase-Protein-Gens α_2 -Makroglobulin. Bindung von IL-6 an seinen spezifischen Rezeptor (IL-6-R) führt zur Rekrutierung zweier gp130-Moleküle. gp130-assoziierte Janus-Kinasen (Jak1) werden durch Ausbildung des Rezeptorkomplexes aktiviert und phosphorylieren Tyrosinreste im cytoplasmatischen Teil von gp130, wodurch Bindungsstellen für STAT-Faktoren (STAT3) über deren SH2-Domänen geschaffen werden. Die STAT-Faktoren werden ebenfalls an Tyrosinresten durch die Janus-Kinasen phosphoryliert, bilden Homodimere und translozieren in den Nucleus, wo sie durch Bindung an spezifische Sequenzen in Promotoren von Akutphase-Protein-Genen deren Transkription aktivieren. gp130, Glykoprotein 130; IL-6, Interleukin-6; IL-6-R, IL-6-Rezeptor; Jak1, Janus-Kinase 1; STAT3, Signal Transducer and Activator of Transcription 3; SH2, Src Homology-Domäne; APRE, Acute Phase Response Element; α_2 -MG, α_2 -Makroglobulin.

IL-6 bindet zunächst an seinen spezifischen Rezeptor (IL-6-R) (Yamasaki *et al.* 1988), der nicht an der intrazellulären Signalkaskade beteiligt ist (Abb. 2). Nach der Ligandbindung ist der Komplex aus Cytokin und Rezeptor fähig, die signalvermittelnde Rezeptorkomponente gp130 zu rekrutieren (Murakami *et al.* 1991), wodurch sich ein tetramerer Komplex aus je einem Molekül IL-6 und IL-6-R sowie zwei Molekülen gp130 bildet (Grötzinger *et al.* 1997). Durch die Bildung des tetrameren Komplexes kommen die gp130-assoziierten Janus-Kinasen in nächste Nähe zueinander, sodaß sie durch inter- oder intramolekulare Phosphorylierung aktiviert werden (Duhé und Farrar 1998; Pellegrini und Dusanter-Fourt

1997; Ihle 1995). Janus-Kinasen (Jak) sind intrazelluläre Tyrosin-Kinasen, von denen bisher vier Mitglieder identifiziert wurden: Jak1, Jak2 und Tyk2, die ubiquitär exprimiert werden, und Jak3, die hauptsächlich in Zellen hämatopoietischer Herkunft gefunden wurde. Durch Studien mit vom Fibrosarcom abstammenden Zellinien, denen entweder Jak1, Jak2 oder Tyk2 fehlten, konnte gezeigt werden, daß die IL-6-Signalkette von der Anwesenheit von Jak1 abhängig ist (Guschin *et al.* 1995). Durch die Aktivierung von Jak1 wird der cytoplasmatische Teil der gp130-Moleküle phosphoryliert. Verschiedene phosphorylierte Tyrosinreste im gp130 dienen dann als Andockstelle für STAT-Transkriptionsfaktoren über deren SH2-Domäne (STAT = Signal Transducer and Activators of Transcription) (Gerhartz *et al.* 1996; Stahl *et al.* 1995).

Bisher wurden sieben verschiedene STAT-Proteine identifiziert: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6, die mit Ausnahme von STAT4 ubiguitär exprimiert werden (Zhong et al. 1994). Für den IL-6-Signalweg spielt vor allem STAT3 eine wichtige Rolle (Takeda et al. 1999; Takeda et al. 1998). Durch die Interaktion von STAT3 über seine SH2-Domäne mit gp130 (Stahl et al. 1995; Heim et al. 1995; Greenlund et al. 1994) wird STAT3 an einem spezifischen Tyrosinrest (Tyrosin 705) durch Jak1 phosphoryliert (Kaptein et al. 1996; Shuai et al. 1993). Nach der Phosphorylierung bilden STAT3-Moleküle wiederum über ihre SH2-Domänen Homodimere (Zhong et al. 1994) und wandern in den Kern (Zhang et al. 1995). Im Zellkern binden die STAT3-Dimere an spezifische DNA-Sequenzen in Zielgenen und aktivieren dadurch die Transkription. Zu diesen Genen gehören auch die Gene von Akutphase-Proteinen, wie z. B. das a2-Makroglobulin-Gen der Ratte (Wegenka et al. 1993). Die DNA-Bindungsdomäne im STAT3-Protein bindet an die DNA-Sequenz TTCN₃GAA (APRE, Akutphase Responsives Element) innerhalb der Promotorregionen von Genen von Akutphase-Proteinen (Horvath *et al.* 1995). Im α_2 -Makroglobulin-Gen ist diese STAT3-Bindungstelle als Tandem arrangiert, was vermuten läßt, daß die STAT-Dimere auf den so arrangierten Bindungsstellen Multimere formen können (Xu et al. 1996; Vinkemeier et al. 1996).

1.5 Prostanoide und Prostanoidrezeptoren

1.5.1 Prostanoid-vermittelte interzelluläre Kommunikation

Neben Cytokinen spielen auch Prostanoide eine Rolle bei der Modulation der Akutphase-Antwort und hepatischer Funktionen während einer Entzündung. Sie werden von Nichtparenchymzellen als Antwort auf eine große Anzahl entzündlicher Stimuli wie LPS (Kuiper *et al.* 1988), Zymosan (Dieter *et al.* 1989), Anaphylatoxine (Hespeling *et al.* 1995; Püschel *et al.* 1993) und proinflammatorische Cytokine wie TNF α (Peters *et al.* 1990) freigesetzt. Die freigesetzten Prostanoide modulieren Funktionen von Hepatocyten in parakriner Weise: Sie beeinflussen die glucogene Aktivität der Hepatocyten durch die Regulation von Enzymaktivitäten (Püschel *et al.* 1993a; Casteleijn *et al.* 1988; Brass und Garrity 1985; Bronstad und Christoffersen 1981), durch die Kontrolle der Expressionsspiegel von glucogenen Schlüsselenzymen (Püschel und Christ 1994) und indirekt auch durch eine Modulation des sinusoidalen Blutflusses (Schieferdecker *et al.* 1999).

Funktionen von Nichtparenchymzellen werden in parakriner und autokriner Weise von Prostanoiden moduliert: TXA_2 oder $PGF_{2\alpha}$ kontrahieren transdifferenzierte Perisinusoidalzellen (Kawada *et al.* 1993), während PGE_1 , PGE_2 oder PGI_2 diese Kontraktion hemmen (Wang *et al.* 1998; Kawada *et al.* 1992).

Die Rolle von Prostanoiden in der Modulation der Akutphase-Antwort bleibt unklar. In verschiedenen in vivo-Studien wurde gezeigt, daß Prostanoide die Akutphase-Antwort sowohl verstärken können (Revhaug et al. 1988; Whicher et al. 1984), ohne Einfluß auf sie sind (Holtslag et al. 1988; Limaos et al. 1985) als auch eine hemmende Wirkung auf sie haben (Waymack und Mason 1989). Im Licht von in vitro-Untersuchungen jedoch scheint eine inhibierende Wirkung am wahrscheinlichsten, da PGE₂ z. B. die LPS-stimulierte Freisetzung von NO (Harbrecht at al. 1997; Harbrecht et al. 1995), reaktiven Sauerstoffspezies oder proinflammatorischen Cytokinen wie IL-6 und TNF α (Callery et al. 1990; Peters et al. 1990) hemmt. Für die LPS-stimulierte Freisetzung von TNF α ist eine autokrine Rückkopplungsschleife beschrieben (Reinstein et al. 1994; Peters et al. 1990): LPS und TNF α stimulieren die Freisetzung von PGE₂ aus Kupfferzellen. Das freigesetzte PGE₂ wiederum hemmt über einen Anstieg an intrazellulärem cAMP die LPS-induzierte Produktion von TNF α . Diese antiinflammatorische Wirkung von PGE₂ auf Kupfferzellen wird über G_S-gekoppelte Prostanoidrezeptoren und einen intrazellulären cAMP-Anstieg vermittelt (Peters *et al.* 1990). Kupfferzellen exprimieren beide G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren, den EP2-R und den EP4-R (Tab. 2, Fennekohl et al. 1999).

PGE₂ hat nicht nur auf Kupfferzellen eine antiinflammatorische Wirkung, sondern vielleicht auch auf Hepatocyten: Es wurde gezeigt, daß PGE₂ die Cytokin-stimulierte *de novo*-Synthese von Akutphase-Proteinen in Hepatocyten der Ratte vermindert (Anbalagan und Sadique 1984). Es erscheint sinnvoll, daß eine solche Wirkung ebenfalls über G_S-gekoppelte PGE₂-Rezeptoren vermittelt wird. Vorangegangene Studien haben jedoch gezeigt, daß Hepatocyten diese Rezeptoren unter normalen Bedingungen sowohl funktionell als auch auf mRNA-Ebene fehlen (Fennekohl *et al.* 1999; Püschel *et al.* 1993).

Prostanoide sind Cyclopentanderivate; sie werden hauptsächlich aus der Arachidonsäure (20:4), einer vierfach ungesättigten Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen gebildet (Abb. 3).



Abb. 3: Prostanoid-Synthese. Die Bildung der Prostanoide erfolgt nach Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Zellmembran. Nach Ring- und Peroxidbildung durch die Cyclooxygenase werden die einzelnen Prostanoide durch spezifische Synthasen (Prostacyclin-Synthase, Endoperoxid-Isomerase D, Endoperoxid-Isomerase E, Endoperoxid-Reductase, und Thromboxan A₂-Synthase) gebildet. TXA₂, Thromboxan A₂; PGI₂, Prostacyclin; PGD₂, Prostaglandin D₂; PGF₂, Prostaglandin F₂, PGE₂, Prostaglandin E₂.

Die Arachidonsäure wird durch einen externen Stimulus von der Phospholipase A₂ aus arachidonsäurehaltigen Phospholipiden der Plasmamembran freigesetzt (Clark *et al.* 1991) und durch das bifunktionelle Enzym Prostaglandin-H-Synthase (Cyclooxygenase) unter Verwendung molekularen Sauerstoffs in das Prostaglandin H₂ umgewandelt (Smith und Marnett 1991). Aus Prostaglandin H₂ werden auf enzymatischem und nichtenzymatischem Weg die Prostaglandine Prostaglandin D₂ (PGD₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin F₂ (PGF₂), sowie Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) gebildet (Samuelsson *et al.* 1978). Die Cyclooxygenase-Produkte werden auch als Prostanoide bezeichnet.

Tab. 1: Einteilung der Prostanoidrezeptoren. Aufgeführt sind der Name des Rezeptors, sein natürlicher Ligand, das intrazellulär vermittelte Signal und ein spezifischer synthetischer Ligand. Der DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R koppeln an G_S-Proteine und stimulieren die cAMP-Bildung; der EP1-R, FP-R und TP-R koppeln an Gq-Proteine und erhöhen den cytoplasmatischen InsP₃- und Ca²⁺-Spiegel; der EP3-R koppelt an ein G_i-Protein und hemmt die Hormon-stimulierte cAMP-Bildung. Die Rezeptor-spezifischen Liganden sind Produkte der Firmen ¹Wellcome, ²Cayman Chemicals, ³Bayer, ⁴Rhone-Poulenc, ⁵ONO, ⁶Schering und ⁷Sigma.

Name	Natürlicher Ligand	Intrazelluläres Signal	Spezifischer Ligand
DP-R	PGD ₂	cAMP \uparrow via G _S	BW245C ¹
EP1-R	PGE ₂	InsP ₃ ↑ via G _q	17-Phenyl-PGE ₂ 2
EP2-R	PGE ₂	cAMP [↑] via G _S	Butaprost ³
EP3-R	PGE ₂	$cAMP \downarrow via~G_i$	M&B 28767 ⁴
EP4-R	PGE ₂	cAMP [↑] via G _S	ONO604 ⁵
FP-R	$PGF_{2\alpha}$	InsP ₃ ↑ via G _q	Fluprostenol ²
IP-R	PGI ₂	cAMP [↑] via G _S	lloprost ⁶
TP-R	TXA ₂	$InsP_3 \uparrow via~G_q$	U46619 ⁷

1.5.2 Prostanoidrezeptoren

Prostanoide vermitteln ihre Signale über heptahelikale Transmembranrezeptoren (Coleman *et al.* 1994; Narumiya *et al.* 1993; Giles *et al.* 1991). Sie bestehen aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, sieben Transmembran-Domänen, drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen und der intrazellulären C-terminalen Domäne (zur Übersicht

Dohlman *et al.* 1991). Sie sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt, die mittels sekundären Botenstoffen wie cAMP oder InsP₃/Ca²⁺ extrazelluläre Signale in intrazelluläre umwandeln. Entsprechend ihrer Spezifität für natürliche und synthetische Agonisten und Antagonisten sowie ihrer Kopplung an unterschiedliche G-Proteine (Coleman *et al.* 1994) und damit Signalketten werden die Prostanoidrezeptoren in acht Gruppen unterteilt (Tab. 1), in denen zumindest für EP3-, FP- und TP-Rezeptor durch alternatives Spleißen weitere Isoformen existieren.

Tab. 2: Differentielle Expression der Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten (HC), Kupfferzellen (KC), sinusoidalen Endothelzellen (SEC) und Perisinusoidalzellen (PSC) der Rattenleber. Aus frisch isolierten Zellen wurde durch Affinitätschromatographie Gesamt-RNA isoliert und als Matritze in eine oligo(dT)-gestartete reverse Transkription eingesetzt. 35 PCR-Cyclen wurden mit spezifischen Primerkombinationen für die Prostanoidrezeptoren oder β -Actin mit seriellen Verdünnungen der cDNAs durchgeführt, um sicherzustellen, daß die PCR-Reaktion nicht gesättigt ist, ausgenommen für den DP-R, der 40 PCR-Cyclen für eine effiziente Amplifikation benötigte ([DP-R]).

Rezeptor	G-Protein	НС	КС	SEC	PSC
[DP-R]	G _S	[-]	[++]	[+]	[+++]
EP1-R	Gq	+++	+++	+++	++
EP2-R	G _s	-	+++	++	(+)
EP3-R	G _i	++	+++	+++	++
EP4-R	G _s	-	+	+++	(+)
FP-R	Gq	+++	-	-	-
IP-R	G _s	-	(+)	++	+++
TP-R	Gq	-	++	+++	(+)
β-Actin	-	+++	+++	+++	+++

In früheren Studien wurde für ein tieferes Verständnis der interzellulären Kommunikation von Nichtparenchymzellen zu Parenchymzellen und zwischen den Nichtparenchymzellen untereinander die Expression dieser acht Prostanoidrezeptoren in den verschiedenen Zelltypen durch RT-PCR untersucht (Fennekohl *et al.* 1999). Es zeigte sich, daß die Prostanoidrezeptoren differentiell in Hepatocyten, Kupfferzellen, sinusoidalen Endothelzellen

und Perisinusoidalzellen exprimiert werden (Tab. 2). Hervorzuheben ist vor allem die exklusive Expression des FP-R in Hepatocyten, das Fehlen von G_s -gekoppelten Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten, die starke Expression des TP-R in sinusoidalen Endothelzellen und des IP-R in Perisinusoidalzellen. Auffällig ist schließlich die parallele Expression beider G_s -gekoppelter PGE₂-Rezeptoren (EP2-R und EP4-R) in Kupfferzellen sowie das Vorhandensein des G_j -gekoppelten EP3-R auch in solchen Zellen, welche den G_s -gekoppelten EP2-R und/oder EP4-R exprimieren.

1.6 Ziel der Arbeit

In einer vorausgegangenen Studie konnte durch RT-PCR gezeigt werden, daß die mRNAs der acht Prostanoidrezeptoren differentiell in frisch isolierten Hepatocyten (Parenchymzellen) und Nichtparenchymzellen der Rattenleber exprimiert werden. In kultivierten Nichtparenchymzellen sollte nun untersucht werden, ob sich durch die Dauer der Kultivierung von Nichtparenchymzellen die Expression der G_S-und G_i-gekoppelten Prostanoidrezeptoren DP-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R und IP-R verändert und ob die auf mRNA-Ebene vorhandenen Prostanoidrezeptoren auch funktionell nachzuweisen sind.

Prostaglandine scheinen als antiinflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle im Sinusoid der Leber bei der Regulation der Akutphase-Antwort zu spielen. Als Gegenspieler der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und TNF α könnten sie helfen, eine exzessive entzündliche Reaktion zu vermeiden. Das Prostaglandin PGE₂, das von Kupfferzellen als Antwort auf proinflammatorische Signale freigesetzt wird, inhibiert in einer autokrinen negativen Rückkopplungsschleife die Synthese von IL-6 und TNFα. Diese antiinflammatorische Wirkung von PGE2 auf Kupfferzellen wird über Gs-gekoppelte PGE2-Rezeptoren und über einen cAMP-Anstieg vermittelt. Da Kupfferzellen beide G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren, den EP2-R und EP4-R exprimieren, sollte mit Hilfe von Mäusen, die defizient für einen dieser beiden Rezeptoren sind, untersucht werden, welcher der beiden Teil der negativen Rückkopplungsschleife ist.

Während Kupfferzellen G_s -gekoppelte Prostanoidrezeptoren konstitutiv exprimieren, sind die mRNAs G_s -gekoppelter Prostanoidrezeptoren (DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R) in unbehandelten primär kultivierten Hepatocyten der Ratte nicht nachweisbar. Zusätzlich zu seiner antiinflammatorischen Wirkung auf Kupfferzellen kann PGE₂ die Cytokin-stimulierte *de novo*-Synthese von Akutphase-Proteinen in Hepatocyten der Ratte hemmen. Es schien sinnvoll, daß diese inhibitorische Wirkung ebenfalls über G_s -gekoppelte PGE₂-Rezeptoren vermittelt wird. Deshalb sollte untersucht werden, ob G_s -gekoppelte Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten der Ratte während entzündlicher Vorgänge induziert werden, um Hepatocyten sensitiv gegenüber einer negativen Kontrolle ihrer Akutphase-Antwort durch PGE₂ zu machen.

2. Material

2.1 Tiere und Tierhaltung

2.1.1 Ratten

Es wurden männliche Wistar-unilever-Ratten aus der Zucht der Firma Winkelmann (Borchen/ Westfalen) bzw. aus der Zucht Charles River (Sulzfeld) verwendet. Zur Isolierung von Hepatocyten wurden 200-300 g schwere Ratten ausgewählt, zur Isolierung der Nichtparenchymzellen 400-500 g schwere Ratten. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus (7-19 Uhr Hellphase) bei einer Raumtemperatur von 19-23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Sie wurden mit dem Aufzuchtsfutter "sniff" (Fa. Spezialdiäten GmbH, Soest/Westfalen) bzw. Rattenhaltungsdiät 1326 (altromin, Gesellschaft für Tierernährung, Lage) unter freiem Nahrungs- und Wasserzugang ernährt.

2.1.2 Mäuse

Mäusestämme, die entweder für den EP2-R oder den EP4-R defizient waren, wurden durch homologe Rekombination von der japanischen Arbeitsgruppe von Prof. Ichikawa hergestellt (Hizaki et *al.* 1999, Segi et *al.* 1998) und zur Verfügung gestellt. Wie die Ratten wurden die Mäuse in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus (7-19 Uhr Hellphase) bei einer Raumtemperatur von 19-23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Sie wurden mit dem Aufzuchtsfutter "sniff" (Fa. Spezialdiäten GmbH, Soest/Westfalen) unter freiem Nahrungs- und Wasserzugang ernährt.

2.2 Biochemikalien

Acrylamid-Lösung	Roth	Karlsruhe
(rotiphorese Gel 30)		
Agarose	Hybaid-AGS	Heidelberg
Ampicillin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ampuwa-H ₂ O	Fresenius	Frankfurt am Main
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol	Hamburg
Benzamidin	Biomol	Hamburg
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth	Karlsruhe

n-Butanol	Merck	Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Desoxynucleotide	Boehringer	Mannheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Merck	Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Biomol	Hamburg
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	Serva	Heidelberg
Ethylenglycol-Tetraacetat (EGTA)	Serva	Heidelberg
Essigsäure	Merck	Darmstadt
Ethanol p. a.	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG	Berlin
Forskolin	ICN	Meckenheim
D-Glucose-Monohydrat	Merck	Darmstadt
Glycerol	Biomol	Hamburg
Glycin	Biomol	Hamburg
Hefeextrakt	GibcoBRL	Eggenstein
2-(4-/2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-	Biomol	Hamburg
Ethansulfonat (HEPES)		
25-Hydroxycholesterol	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Calbiochem-Novabiochem	Bad Soden
lloprost	Schering	Berlin
Indomethacin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Insulin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Interleukin-6	Strathmann Biotech GmbH	Hannover
Isopropyl-β-D-galactopyranosid	Biomol	Hamburg
(IPTG)		
Isopropanol	Merck	Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka	Neu-Ulm
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Lactatsirup	Sigma-ALdrich	Deisenhofen
LB-Agar	GibcoBRL	Eggenstein
Leupeptin	Biomol	Hamburg
Lipopolysaccharid (LPS, E. coli	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
O55:B5)		
Magermilchpulver	Nestle	Frankfurt am Main
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	Darmstadt

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck	Darmstadt
Medium M199 mit Earle's Salzen	GibcoBRL	Eggenstein
ohne Natriumhydrogencarbonat		
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Methanol	Merck	Darmstadt
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck	Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Merck	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol	Hamburg
Natriumdihydrogenphosphat-	Merck	Darmstadt
Dihydrat		
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-	Merck	Darmstadt
Dihydrat		
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Neonatales Kälberserum (NCS)	Biochrom KG	Berlin
Nembutal (Pentobarbital)	Serva	Heidelberg
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Nycodenz	Life Technologies GmbH	Eggenstein
Oligo-(dT ₁₂₋₁₈)	Pharmacia Biotech	Freiburg
ONO613	ONO Pharmaceutical	Kyoto, Japan
	Company	
ONO604	ONO Pharmaceutical	Kyoto, Japan
	Company	
Pefabloc	Biomol	Hamburg
Penicillin	GibcoBRL	Eggenstein
Pertussistoxin	Calbiochem-Novabiochem	Bad Soden
Percoll	Pharmacia Biotech	Freiburg
Prostaglandin D ₂ (PGD ₂)	Calbiochem-Novabiochem	Bad Soden
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Calbiochem-Novabiochem	Bad Soden
Phosphorsäure	Merck	Darmstadt
Ponceau S	Sigma	Deisenhofen
Pyruvat (Natriumsalz)	Merck	Darmstadt
Rp-Adenosin-3',5'-cyclisches	Biomol	Hamburg
Monophosphorothioat (Rp-cAMPS)		

RPMI 1640 Pulvermedium ohne	Biochrom KG	Berlin
Natriumhydrogencarbonat		
Salzsäure, 37% (v/v)	Merck	Darmstadt
Schwefelsäure	Roth	Karlsruhe
Serva Blue G Nr. 35050	Sigma	Deisenhofen
SOB-Medium	GibcoBRL	Eggenstein
Streptomycin	GibcoBRL	Eggenstein
N,N,N',N'-	Serva	Heidelberg
Tetramethylethylendiamin		
(TEMED)		
Tetracyclin	GibcoBRL	Eggenstein
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
(TMB)		
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Biomol	Hamburg
Trypton	GibcoBRL	Eggenstein
Tween-20	Merck	Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Roth	Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	Biomol	Hamburg
(X-Gal)		

Die Gase Carbogen [95% O_2 , 5% CO_2 , (19:1)] und Stickstoff wurden bei Messer-Griesheim, Düsseldorf bezogen.

2.3 Geräte

Automatische Pipettierhilfe, Gilson, Typ	Eppendorf	Hamburg
Pipetmann P10,P20, P200, P1000		
Automatische Pipettierhilfe, Finnpipetten	Labsystems	Frankfurt am Main
Digital		
Automatische Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann	Eberstadt
Automatische Pipettierhilfe Typ	Eppendorf	Hamburg
Multipette plus		
Beckman JE-6 Elutriationsrotor	Beckman Instruments	München
Beckman J-21 Elutriationszentrifuge	Beckman Instrument	München
Begasungsbrutschrank B 5060 EK/02,	Heraeus	Hanau
Gas-Monitor		
Begasungsbrutschrank Nuaire IR	Zapf Instruments	Sarstedt
Autoflow		

Capacitance Extender Plus	BioRad	München
Chemi Doc™-System	BioRad	München
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik	Oberschleißheim
Eismaschine	Ziegra	Isernhagen
Elektrophorese-System mini Protean II	BioRad	München
ELISA-Plattenphotometer MR 5000	Dynatech	Eschborn
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf	Hamburg
Flachbett-Elektrophoresekammer	Biometra	Göttingen
Gene Pulser II	BioRad	München
Gene-Quant, RNA/DNA Calculator,	Pharmacia	Freiburg
Model 80-2104-98		
Halbmikro-Osmometer	Knauer	Berlin
Heizblock	Eppendorf	Hamburg
Hettich-Zentrifugen Rotina 35 und	Hettich	Tuttlingen
Universal 16		
Hettich-Rotoren 1717 und 1624	Hettich	Tuttlingen
High Voltage Power Pack P30	Biometra	Göttingen
Laborbrenner Gasprofi 1	Wartewig-Labortechnik	Göttingen
Laborwaage Sartorius 2434, 2406, 1219	Sartorius	Göttingen
MP		
Labofuge GL Zentrifuge	Heraeus	Hanau
Mikroplatten-Luminometer lucy 1	Anthos labtec	Salzburg, Österreich
	instruments	
Magnetrührer Ikamag RCT	Jahnke & Kunkel	Staufen im Breisgau
Magnetrührer Ika-Combimag RET	Jahnke & Kunkel	Staufen im Breisgau
Magnetrührer MR 2002 und 3001	Heidolph	Göttingen
Masterflex-Pumpe Modell 751920	Novo direct	Kehl am Rhein
Megafuge 1.0 R-Zentrifuge	Heraeus	Hanau
Mikroskop Wilovert S und Wilovert A	Hund	Wetzlar
Mikrowellengerät, Typ Privileg	Quelle	Fürth
Milliporeanlage "Milli-Q", Sterilfilter	Millipore	Neuisenburg
Peristaltikpumpe PD5001 mit Pumpkopf	Heidolph	Göttingen
SP quick d		
Phasenkontrast-Umkehrmikroskop	Zeiss	Jena
pH-Meter CG 822	Schott	Hofheim am Taunus
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW	Weilheim
pH-Meter 761 Calimatic	Knick	Berlin
Photometer Lamda UV/VIS	Perkin-Elmer	Überlingen
Photometer Ultrospec 4050	LKB (Pharmacia)	Freiburg im Breisgau

Pulse Controller Plus	BioRad	München
Quarzdestille DESTAMAT Bi 18E	Heraeus	Hanau
Schüttelapparat 3006	GFL	Burgwedel
Schüttelinkubator 3031	GFL	Burgwedel
Sequenziergerät Model CEQ-2000	Beckman	München
SIGMA Rotor 12154-H	SIGMA	Osterode am Harz
SIGMA Zentrifuge 3K30	SIGMA	Osterode am Harz
Sorvall Rotor SS 34	Du Pont Instruments	Bad Homburg
Sorvall Rotor GSA	Du Pont Instruments	Bad Homburg
Sorvall Zentrifuge RC 5B plus	Du Pont Instruments	Bad Homburg
Sicherheitswerkbank 4SB, 4A	Gelaire	Michigan, USA
Sicherheitswerkbank LaminAir HB2472	Heraeus	Hanau
Sicherheitswerkbank Nu Aire Class II	Zapf Instruments	Sarstedt
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus	Hanau
Spannungsgerät	Biometra	Göttingen
Spectralphotometer Ultrospec	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Taumler Rocky 3D	Fröbel Labortechnik	Lindau
Thermocycler 60/2	Biomed	Theres
Thermocycler T3	Biometra	Göttingen
Thermoshaker Schutron TS2-24	Haep Labor Consult	Bovenden
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus	Hanau
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad	München
UV-Leuchtkasten	Schütt	Göttingen
Univapo 150H beheizbare Zentrifuge mit	Uniquip	Martinsried
Kühlfalle Unicryo MC 2L-60°C und		
Univac Vakuumpumpe		
Videosystem UVP easy	Herolab	Wiesloch
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, N.Y., USA
Wasseraufbereitungssystem Typ HP6	ТКА	Niederelbert
UV/UF		
Wasserbad ecoline O11 mit	Lauda	Lauda-Königshofen
Einhängethermostat A100		
Wasserbad Haake D1	Schütt	Göttingen
Wärmeschrank Modell 600	Memmert	Schwabach
2.4 Verbrauchsmaterialien

Braunülen 18 G 1¾" (1,3 x 45 mm), 14	Braun Melsungen	Melsungen
G 2" (2,2 x 50 mm), Venenverweil-		
kanülen aus PE		
Einmal-Injektions-Kanülen	Braun Melsungen	Melsungen
Einmal-Spritzen 1 ml, 5 ml und 10 ml	Braun Melsungen	Melsungen
Einmal-Spritzenfilter 0,2 µm und 0,45 µm	Sartorius	Göttingen
Faltenfilter	Schleicher und Schüll	Dassel
3MM-Filter	Whatman	Maidstone,
		England
Latexhandschuhe, rotiprotect	Roth	Karlsruhe
Mikrotiterplatte (96-Well), Microlon	Greiner	Nürtlingen
Nylonnetz Scrynel NY 79 HD	Züricher	Zürich, Schweiz
	Beuteltuchfabrik	
Parafilm	American National	Greenwich, USA
	Can™	
Pasteurpipetten	Brand	Wertheim
Pipettenspitzen	Greiner	Nürtlingen
Polypropylenröhrchen 15 ml, 50 ml, steril	Sarstedt	Nürnbrecht
Polyvinylidendifluorid-(PVDF-)Membran	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Schnappdeckel-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt	Nürnbrecht
Schraubdeckel-Reaktionsgefäße	Greiner	Nürtlingen
1,5 ml und 2 ml		
24-Well-Gewebekulturplatte	Greiner	Nürtlingen
Zellkultur-Mikrotiterplatte (96-Well),	Greiner	Nürtlingen
F-Form		
Zell- und Gewebekulturschalen	Nunc	Wiesbaden
35 x 10 mm		
Zell- und Gewebekulturschalen	Sarstedt	Nürnbrecht
60 x 15 mm		

2.5 Käufliche Reinigungs- und Nachweissysteme

2.5.1 Radioimmunoassays und ELISAs

cAMP[¹²⁵ I] Biotrak Assay system	Amersham-Pharmacia	Freiburg
PGE ₂ [¹²⁵ I] Biotrak Assay system	Amersham-Pharmacia	Freiburg
OptEIA™ Set: Mouse TNFα	Pharmingen	San Diego, USA

2.5.2 Nucleinsäure-Reinigung

DNeasy Total DNA Kit	Qiagen	Hilden
RNeasy Total DNA Kit	Qiagen	Hilden
GFX™ Micro Plasmid Prep	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Jetsorb	Genomed	Bad Oeynhausen
Jetstar	Genomed	Bad Oeynhausen

2.5.3 Chemilumineszenz-Nachweissysteme

SuperSignal [®] West Pico	Pierce	Rockford, Illinois, USA
Chemiluminescent Substrate		
Luciferase Assay System	Promega	Madison, USA
2.5.4 DNA-Sequenzierung		
CEQ Dye terminator Cycle	Beckman Coulter	München
Sequencing Kit	Bioresearch	

2.6 Enzyme

2.6.1 Collagenase H

Clostridium histolyticum, EC 3.4.24.3 Boehringer, Mannheim

Das Enzym kann für die Dissoziation von Geweben und für die Präparation von Zellkulturen zur Etablierung von Primärkulturen benutzt werden. Die Collagenase ist eine Protease mit einer Spezifität für eine X-Gly-Bindung innerhalb der Sequenz Pro-X-Gly-Pro, wobei X am häufigsten eine neutrale Aminosäure darstellt. Die Sequenz findet man in hoher Häufigkeit im Collagen, aber sehr selten in anderen Proteinen. Collagenase H ist für die Isolation von Hepatocyten funktionsgetestet.

2.6.2 DNase I

Rinderpankreas, Reinheitsgrad II, EC 3.1.21.1

Boehringer, Mannheim

Während der Dissoziation von Gewebe werden einige Zellen lysiert, was zur DNA-Freisetzung aus diesen Zellen führt. Makromolekulare DNA kann ein Verklumpen von Zellen bewirken. Die Zugabe von DNase I führt zum Abbau extrazellulärer DNA. Sie verhindert damit den Verlust von Zellen. Das Enzym ist eine Doppelstrang-spezifische Endonuclease und hinterläßt 5'-Phosphodinucleotide oder 5'-Phosphopolynucleotide. Eine optimale Aktivität wird nur in Gegenwart von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen erreicht, da Ca²⁺-Ionen von der DNase I und Mg²⁺-Ionen vom DNA-Substrat gebunden werden müssen. Die DNase spaltet unter optimalen Bedingungen beide Stränge des Substrates, ansonsten kommt es zu Einzelstrangschnitten. Cytosolisches Actin ist ein starker Inhibitor der DNase I.

2.6.3 Pronase E

Streptomyces griseus, EC 3.4.24.4

Merck AG, Darmstadt

In Verbindung mit anderen Enzymen (z. B. Collagenase) kann Pronase E für die Isolation verschiedener Zelltypen verwendet werden. Es handelt sich bei der Pronase E um eine Mischung verschiedener Proteasen mit unterschiedlichen proteolytischen Aktivitäten.

2.6.4 PRO-HA-DNA-Polymerase

Pyrococcus archaebacterium, EC 2.7.7.7

Eurogentec, Seraing, Belgien

Das Enzym stammt aus dem thermophilen Eubacterium *Pyrococcus archaebacterium* und ist beständig gegen lange Inkubationszeiten und Temperaturen bis 95°C. Die PRO-HA-DNA-Polymerase ist eine Mg²⁺-abhängige 5'-3'-DNA-Polymerase, die keine 5'-3'- und 3'-5'-Exonucleaseaktivitäten besitzt. Als Matrize dient denaturierte oder Einzelstrang-DNA. Das Enzym zeigt die höchste Aktivität bei einem pH-Wert um 9 und Temperaturen um 75°C. Die hohe Prozessivität der Polymerase und das hohe Temperaturoptimum ermöglichen die Verwendung dieses Enzyms für die PCR, aber auch für die DNA-Sequenzierung. Das Enzym hängt sequenzabhängig ein zusätzliches A an das 3'-Ende neusynthetisierter DNA-Moleküle.

2.6.5 Reverse Transkriptase RNase H-

Superscript[™] II RNase H⁻RT aus *E. coli*, EC 2.7.7.49 GibcoBRL, Eggenstein

Das Enzym ist eine DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA, DNA oder ein RNA-DNA-Hybrid als Matrize zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges verwendet. Die Reverse Transkriptase wird von einem klonierten M-MLV-RT Gen produziert. Das Enzym wurde gentechnisch durch gezielte Einführung von Punktmutationen im Bereich des aktiven Zentrums der RNase H-Aktivität verändert. Dadurch wird die RNase-Aktivität auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau reduziert. Diese strukturelle Modifikation verhindert den Abbau des RNA-Moleküls während der Synthese von Erststrang-DNA, die volle Polymeraseaktivität wird jedoch aufrechterhalten. Das Enzym eignet sich zur mRNA-abhängigen cDNA-Synthese bei Temperaturen bis zu 45°C.

2.6.6 Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz

Mlul	Hybaid-AGS	Heidelberg	A*CGCGT
Xhol	Hybaid-AGS	Heidelberg	C ⁺ TCGAG

2.6.7 T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase aus E. coli, EC 6.5.1.1

GibcoBRL, Eggenstein

Die T4-DNA-Ligase wurde aus *E. coli* Bakterien, die mit dem T4-Phagen (Wildtyp) infiziert worden waren, isoliert. Das Enzym benötigt ATP als Cofaktor. Im ersten Reaktionsschritt wird AMP unter Freisetzung von Pyrophosphat kovalent über eine Phosphoamidbildung mit einem Lysinrest des Enyzms verknüpft. Anschließend wird die Adenylat-Einheit auf die 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Strangs übertragen. Durch einen nucleophilen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe des anderen DNA-Strangs auf die aktivierte 5'-Phosphoryleinheit des ersten Strangs kommt es zur Bildung einer Phosphodiesterbindung unter Freisetzung von AMP. Das pH-Optimum liegt zwischen 7,2 und 7,8. Die T4-Ligase kann neben zwei DNA-Strängen auch DNA- und RNA-Moleküle miteinander verknüpfen. Sie ist in der Lage, sogenannte "glatte", aber 5'-phosphorylierte Enden miteinander zu verbinden, d. h. DNA-Enden, die keine einzelsträngigen Bereiche an ihren Enden aufweisen. Die T4-DNA-Ligase benötigt bivalente Ionen wie Mg²⁺ sowie reduzierende Reagenzien wie Mercaptoethanol oder DTT. Gehemmt wird die T4-DNA-Ligase durch einwertige Alkalimetalle, NH4⁺ und Spermin.

2.7 Molekulare Längenstandards

2.7.1 DNA-Längenstandard

SmartLadder	Eurogentec	Seraing, Belgien
2.7.2 Protein-Längenstandard		
HMW-Standard	Pharmacia	Freiburg
Zusammensetzung		
Protein	Molekulargewicht	Menge
Myosin	212 000	25 µg
α_2 -Makroglobulin	170 000	100 µg
β -Galaktosidase	116 000	16 µg
Transferrin	76 000	17 µg
Glutamat-Dehydrogenase	53 000	18 µg

Der HMW-Standard lag als Lyophilisat vor, wurde in 100 μ l H₂O gelöst, 5 min auf 95°C erhitzt und bei 4°C gelagert.

2.8 Oligonucleotide

2.8.1 "sense"-Oligonucleotide

mDP-1F	5'd ACCCGCCGCCCTCGGTCTT
rα ₂ -MG-1F	5'd GAGCTCCGGGTCACTGCTCAA
rEP2-1F	5'd CATGGCCCTGGAACGCTACC
rEP3-1F	5'd GCGGCGGGCGATGGAGGAGAG
rEP4-1F	5'd TCTCTTACATGTACGCGGGCTTCA
rIP-1F	5'd CATCGGCGTTTGCACTGTTGGT
rβ-Act-1F	5'd GATATCGCTGCGCTCGTCGTC
α ₂ MG- <i>Mlu</i> l-1F	5'd CGGCGGACGCGTTGGGGGGGGGGAGAAGCCGATTAT

F = forward; m = mouse; r = rat

2.8.2 "antisense"-Oligonucleotide

mDP-2R	5'd AGCAGCGCCATGAGGCTGGAGTAG
α ₂ -MG-2R	5'd GAAAATGTGCCCGAAGAACG
rEP2-2R	5'd TCAGTGAAGTCCGACAACAGAGG
rEP3-2R	5'd GCGGGACACCAGGGCTTTGATG
rEP4-2R	5'd GTCTGGCAGGTATAGGAGGGTGTG
rIP-2R	5'd ATGGCCTGCGTGAATCCTCTGA
rβ-Act-2R	5'd CCTCGGGGCATCGGAACC
α ₂ -MG- <i>Xho</i> l-1R	5'd GGCGCCCTCGAGTGGTGAGGAGCAGCTAGACTTTAT

R = reverse; m = mouse; r = rat

"sense"- und "antisense"-Oligonucleotide wurden von den Firmen Pharmacia Biotech (Freiburg), NAPS Göttingen GmbH (Göttingen) und MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Die Primer-Sequenzen wurden aus folgenden Sequenzen erstellt:

Matrize	Primer	Genbank Acc.No.	Positionen
DP-R:	mDP-1F; mDP-2R	D29764	467-485; 824-847
α <mark>2</mark> -MG:	α ₂ -MG-1F; α ₂ -MG-2R	JO2635	3300-3320; 3898-3916
	α ₂ -MG- <i>Mlu</i> l-1F; α ₂ -MG- <i>Xho</i> l-1R	M23567	4286-4307;111-130;
		M22750	4529-4506;1595-1577
EP2-R:	rEP2-1F; rEP2-2R	U48858	498-517; 1095-1117
EP3-R:	rEP3-1F; rEP3-2R	X83855	27-47; 834-855
EP4-R:	rEP4-1F; rEP4-2R	D28866	731-753; 1366-1389
IP-R:	rIP-1F; rIP-2R	D28966	306-327; 939-960
β -Actin:	rβ-Act-1F; rβ-Act-2R	J00691	1251-1271; 2553-2570

Tab. 3: Primersequenzen.

2.9 Polyklonale Antikörper

Kaninchen-anti-Mensch α_2 -Makr	o- Sigma	Deisenhofen
globulin-Immunglobuline G (H+L)	1	
Produkt-Nr. M1893; Lot-Nr. 099H	9040	
Kaninchen-anti-Maus Phospho-S	STAT3 New England Biolabs	Frankfurt a. M.
(Tyr705)-Antikörper		
Katalog-Nr. #9131		
Kaninchen-anti-Maus Phospho	o-Jak1 Dianova	Hamburg
(Tyr1022 und 1023)-Antikörper		
Katalog-Nr. OPA1-03051		
Peroxidase-gekoppelte Ziege	e-Anti- BioRad	München
Kaninchen-Immunglobuline G (H	+L)	
Katalog-Nr. 170-6515; Lot-Nr. 85	704	

2.10 E. coli XL-1 (blue) Bakterien

E. coli XL-1 (blue) Stratagen Heidelberg recA1;endA1;gyrA96;thi-1;hsdR17;subE44;relA1;lac[F';proAB;lacl^qZWM15;Tn10(tet^r)]

2.11 Vektoren

2.11.1 pGEM[®]-T-Vektor

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das Plasmid pGEM[®]-T (Abb. 4) der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Es besteht aus ca. 3000 Basenpaaren und wurde durch Schneiden des pGEM[®]-5Zf(+)-Vektors (Promega, Madison, USA) mit *Eco*RV und Addition eines 3'-terminalen Thymidins (T) an beide Enden hergestellt. Diese 3'-T-Überhänge verbessern die Effizienz bei der Ligation mit PCR-Produkten in das Plasmid. Die Ligation nutzt die Tatsache, daß bestimmte thermostabile Polymerasen, wie *Taq*-DNA-Polymerasen, Matrizen-unabhängig ein einzelnes Adenosin (A) an das 3'-Ende von PCR-Produkten hängen. Zusätzlich enthält der Vektor eine sog. Polylinkerregion, die durch die Aneinandereihung singulärer Restriktionschnittstellen der Einklonierung dient und innerhalb der α -Peptid-codierenden Region des Enzyms β -Galactosidase liegt. Durch die Insertion von PCR-Produkten in dieses α -Peptid wird dieses inaktiviert und erlaubt so die Identifikation rekombinanter Klone durch das Blau/Weiß-Screening. Der Polylinker wird von

Primersequenzen (universeller und reverser Primer), die für die DNA-Sequenzierung notwendig sind und von den Promotoren für die T7- und SP6-RNA-Polymerase flankiert.



Abb. 4: Restriktionskarte des Vektors pGEM®-T. Amp^r = Ampicillinresistenzgen, lacZ = lacZ-Gen (codiert für β -Galactosidase), T7 = T7-RNA-Polymerase-Promotor, SP6 = SP6-RNA-Polymerase-Promotor, ori = Replikationsstartstelle des Plasmids, f1 ori = Phage f1 Replikationsstartstelle. Die anderen Abkürzungen bezeichnen Restriktionsendonucleasen.



Abb. 5: Restriktionskarte des Vektors pGL3-Basic. Amp^r = Ampicillinresistenzgen, luc+ = Luciferase-Reportergen, ori = Replikationsstartstelle des Plasmids, f1 ori = Phage f1 Replikationsstartstelle. Die anderen Abkürzungen bezeichnen Restriktionsendonucleasen.

2.11.2 pGL3-Basic-Vektor

Mit dem pGL3-Basic-Vektor der Firma Promega (Madison, USA, Abb. 5), der ein Luciferase-Reportergen enthält, können quantitative Analysen zur Regulation der Genexpression durchgeführt werden. Veränderungen in der Luciferase-Reporteraktivität korrelieren direkt mit der transkriptionellen Aktivität der in die Polylinkerregion klonierten regulatorischen Genelemente, wenn sie in mit pGL3-Basic transfizierten Zellen exprimiert werden. Der pGL3-Basic-Vektor enthält eine modifizierte Luciferase-cDNA aus der nordamerikanischen Feuerfliege (luc+), die sicherstellt, daß das Luciferase-Reportergen selbst nicht zu transkriptionellen Signalen beiträgt. Das SV40 späte poly(A)-Signal sorgt für eine effiziente Prozessierung der Luciferase-RNA. Das synthetische poly(A)-Signal, das stromaufwärts der Polylinkerregion liegt, dient der Termination von Transkriptionen im Vektor-Rückgrat.



Abb. 6: Restriktionskarte des Vektors pRc/CMV. Der Vektor eignet sich für transiente und stabile Expression von rekombinanten Proteinen in Säugetierzellen. Er besitzt für eine hohe Transkriptionsrate die Enhancer/Promotor-Sequenzen des frühen Gens des menschlichen Cytomegalie-Virus (CMV) und zur Stabilisierung der mRNA die Transkriptionssignale und RNA-Prozessierungssignale des Rinder-Wachstumshormongens. Das Plasmid beinhaltet weiterhin eine multiple Klonierungsstelle und flankierend dazu die T7- und Sp6-Promotoren für die *"in vitro*"-Transkription. Für die Selektion und Vermehrung in *E. coli* ist auf dem Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen und für die Selektion in Säugetierzellen das Neomycin-Resistenzgen codiert, welches Zellen Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 verleiht.

2.11.3 Plasmid pRc/CMV-STAT3

Das Plasmid pRc/CMV-STAT3, das für Co-Transfektionen von Hepatocyten verwendet wurde, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. Trautwein zur Verfügung gestellt. Es enthält die 2,9 kb große cDNA des STAT3-Proteins aus der Ratte einkloniert in die *Not*l- und *Apa*l-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pRc/CMV-STAT3 der Firma Invitrogen (San Diego, USA, Abb. 6), so daß das STAT3-Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht.

3. Methoden

> Zellbiologische Methoden <

3.1 Isolierung, Reinigung und Kultivierung von Hepatocyten der Ratte nach Meredith (1988)

Hepatocyten wurden durch Lösen des Zellverbands der Leber mittels Perfusion mit Ca²⁺freiem und EDTA-haltigem Puffer isoliert. Sie wurden durch niedrigtourige Zentrifugation und durch Abtrennen der Nichtparenchymzellen und Zelltrümmer mit Hilfe eines einstufigen Percoll-Dichtegradienten gereinigt.

3.1.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H_2O angesetzt, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4°C aufbewahrt.

Perfusionspuffer-Stammlösung (10 x)

NaCl	1400 mM	81,820 g/l
KCI	50 mM	3,728 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	8 mM	1,626 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	16 mM	2,848 g/l
KH ₂ PO ₄	4 mM	0,544 g/l

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 eingestellt.

Perfusionspuffer		
Puffer-Stammlösung (10 x)	1 x	0,1 //
NaHCO3	25 mM	2,100 g/l
EDTA	2,0 mM	0,745 g/l
D-Glucose x H ₂ O	15 mM	2,973 g/l
Lactat	2 mM	282 µl 7,1 M Lactatsirup/l
Pyruvat	0,2 mM	0,022 g/l

Das Medium wurde bei 37°C für 45 min mit Carbogen äquilibriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Osmolarität kontrolliert (270-300 mOsmol/l) und ggf. mit H₂O oder NaCl eingestellt.

Waschpuffer		
Puffer-Stammlösung (10 x)	1 x	0,11/1
CaCl ₂ x H ₂ O	1 mM	0,147 g/l
Das Medium wurde bei 37°C für 45 m	in mit Carbogen äquilibriert und	der pH-Wert auf 7,4
eingestellt. Anschließend wurde die 0	Osmolarität kontrolliert (270-300	mOsmol/l) und ggf.
eingestellt.		
Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	nsmedium	
Percoll		27,8 ml
Puffer-Stammlösung (10 x)		4,2 ml
Physiologische NaCl-Lösung		
NaCl	0,9% (w/v)	9 g/l
Nembutal		
Nembutal	4% (w/v)	40 g/l
Das Nembutal wurde in physiologische	r NaCl-Lösung (0,9% (w/v)) gelös	t.
<u>Medium 199 (M199)</u>		
Pulvermedium M199 mit		
Earle's Salzen ohne NaHCO3		9,77 g/l
D-Glucose x H ₂ O	5,5 mM	1,10 g/l
HEPES	15 mM	3,57 g/l
NaHCO ₃	18 mM	1,51 g/l
BSA	0,2% (w/v)	2,00 g/l
Das Medium wurde mit Carbogen äqui	ibriert und der pH-Wert auf 7,4 ei	ngestellt.

Insulin-Stammlösung		
Insulin	0,01 mM	2,9 mg
BSA	0,1% (w/v)	0,05 g

ad 50 ml 0,9% (w/v) NaCl-Lösung.

Insulin wurde bei pH 3 in 20 ml 0,9% (w/v) NaCl-Lösung gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und anschließend BSA zugegeben. Die Lösung wurde auf 50 ml aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert. Die Lösung wurde durch einen 0,4 μ m-Filter sterilfiltriert und in Aliquots bei –20°C gelagert.

Dexamethason-StammlösungDexamethason0,1 mMEthanol p. a.0,3% (v/v)

ad 50 ml 0,9% (w/v) NaCI-Lösung.

Dexamethason wurde zunächst in Ethanol p.a. gelöst und dann mit 0,9% (w/v) NaCI-Lösung verdünnt. Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots bei –20°C gelagert.

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Antibiotika)

Penicillin	13,7 mM	0,63 g/l
Streptomycin	16,9 mM	1,00 g/l
Penicillin und Streptomycin wurden getrennt in	0,9% (w/v) NaCI-Lösung gelöst,	anschließend
vereinigt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.	Die Lösung wurde durch einen	0,4 µm-Filter
sterilfiltiriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.		

M199-Kulturmedium I

NCS	4% bzw. 0% (v/v)	4 ml bzw. 0 ml
Insulin-Stammlösung (10 ⁻⁵ M)	5 x 10 ⁻¹⁰ M	5 µl
Dexamethason-Stammlösung (10 ⁻⁴ M)	10 ⁻⁷ M	100 µl
Antibiotika	1% (v/v)	1 ml
ad 100 ml Medium M199.		

<u>25-Hydroxycholesterol-Lösung</u>

25-Hydroxycholesterol0,25% (w/v)25 mgad 10 ml Ethanol.

Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots von 1 ml bei –20°C gelagert.

3.1.2 Nicht-rezirkulierende in situ-Perfusion der Rattenleber zur Isolierung von Hepatocyten

Männliche Wistar-Ratten (200-300 g) wurden durch intraperitoneale Injektion von 80 mg Nembutal/kg Körpergewicht oder 100 µl Narcoren/100 g Körpergewicht narkotisiert. Anschließend wurde die Ratte mit Stecknadeln auf dem Präparationstisch fixiert und die Bauchregion mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert. Nach Entfernen der Bauchhaut wurde das Abdomen durch eine Längsinzision entlang der *Linea alba* bis zum *Processus xyphoideus* eröffnet. Der Leberhilus wurde durch Verlagern des Darmkonvuluts freigelegt und die *Vena portae* freipräpariert. Zum späteren Fixieren der Braunüle wurde eine Ligatur locker um die *Vena portae* cranial der *Vena lienalis* gelegt. Die *Vena portae* wurde nun mit einer Braunüle

2 mg

150 µl

kanüliert, die *Vena cava inferior* distal der *Vena renales* eröffnet und die Leber mit einem Druck von 20-25 cm Wassersäule und einer Flußgeschwindigkeit von 40 ml/min mit dem durch einen Oxygenator auf 37°C erwärmten Perfusionspuffer (ca. 2 l) 45-60 min nicht-rezirkulierend perfundiert. Nach Eröffnen der *Vena cava inferior* wurde die Braunüle in der *Vena portae* mit der Ligatur in der gewünschten Position fixiert. Während die Leber blutleer gespült wurde, wurde der Thorax durch bis zur *Clavicula* reichende paramediane Längsinzisionen eröffnet.

3.1.3 Präparation von Hepatocyten der Ratte

Nach der Perfusion wurde die Leber aus dem Abdomen freipräpariert und in eine Glasschale überführt, die mit Waschpuffer gefüllt war. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Leberkapsel zerrissen und möglichst vollständig vom Leberhilus abgezogen, wodurch sich die Zellen aus den Leberlappen lösten. Zur Entfernung von Resten des Bindegewebes und größerer Zellverbände wurde die Zellsuspension durch ein mit Waschpuffer befeuchtetes Nylon-Sieb (Porengröße 80-100 μ m) filtriert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 min bei 50 x *g* (300 rpm, Heraeus-Labofuge GL) und Raumtemperatur zentrifugiert, damit Nichtparenchymzellen sowie tote Zellen und Zelltrümmer, die nach der Zentrifugation im Überstand verbleiben, von den Hepatocyten im Sediment getrennt werden konnten. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment in 50 ml Waschpuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert.

3.1.4 Reinigung von Hepatocyten der Ratte durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Das Zellsediment nach der zweiten Zentrifugation wurde mit Waschpuffer auf 16 ml aufgefüllt und mit 32 ml Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugationsmedium vermischt. Die Percoll-Endkonzentration betrug 58% (v/v). Diese Suspension wurde 5 min bei 800 x g (2100 rpm, Hettich-Zentrifuge Rotina 35) und Raumtemperatur zentrifugiert. Nichtparenchymzellen, tote Hepatocyten sowie Zelltrümmer, die sich in einer Bande auf dem Gradienten befanden, wurden zusammen mit dem überschüssigen Puffer abgesaugt. Das Hepatocytensediment wurde ausgewogen und mit M199 auf 10 ml aufgefüllt.

3.1.5 Mikroskopische Zellzählung

Zur Auszählung der Hepatocyten wurden 198 µl M199 in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit 2 µl der Hepatocytensuspension gemischt (1:100-Verdünnung). Die Suspension wurde in eine mit einem Deckglas verschlossene Neubauer-Kammer (0,0025 mm²/Kästchen bei einer Tiefe von 0,100 mm) gefüllt und unter dem Mikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt.

3.1.6 Kultivierung von Hepatocyten der Ratte

Die Hepatocytensuspension wurde sofort nach ihrer Herstellung mit Medium M199, dem 4% (v/v) neonatales Kälberserum zur besseren Anheftung der Hepatocyten an den Boden der Polystyrolschalen, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung, 10^{-7} M Dexamethason und 5 x 10^{-10} M Insulin als permissiven Wachstumsfaktor zugesetzt war (= M199-Kulturmedium I), gemischt. Zur Transfektion primär kultivierter Hepatocyten wurde dem Medium noch zusätzlich 2,5 µg/ml 25-Hydroxycholesterol zur Verbesserung der Transfektionseffizienz zugegeben. Die Kultivierung der Hepatocyten erfolgte unter verschiedenen Bedingungen entsprechend der nachfolgenden Verwendung der Zellen:

Art der Verwendung	Zellzahl/Volumen der	Ø der Kulturschale
	ausplattierten Suspension	
RNA-Isolierung	2,0 x 10 ⁶ Hepatocyten/3,0 ml	60 mm
Funktionelle Assays	1,2 x 10 ⁶ Hepatocyten/1,5 ml	35 mm
Westernblot	1,2 x 10 ⁶ Hepatocyten/1,5 ml	35 mm
Transfektion	7,0 x 10 ⁵ Hepatocyten/1,5 ml	35 mm

Der Anheftungsphase von 4 h (bei transfizierten Zellen 5 h) folgte ein Mediumwechsel mit M199-Kulturmedium I, nach dem die Hepatocyten in M199 mit den oben angegebenen Hormon- und Antibiotika-konzentrationen aber ohne fetales Kälberserum und bei Transfektionsexperimenten ohne 25-Hydroxycholesterol weiterkultiviert wurden. Es wurden 1,5 ml Medium pro 35 mm-Kulturschale bzw. 3,0 ml Medium pro 60 mm-Kulturschale zugegeben. Alle 24 h wurde ein Mediumwechsel mit M199-Kulturmedium I durchgeführt. Die Inkubation der Hepatocyten erfolgte in Begasungsbrutschränken in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) CO_2 bei 37°C.

3.2 Isolierung, Reinigung und Kultivierung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte

3.2.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H_2O angesetzt, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4°C gelagert.

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

NaCl	136,9 mM	8,000 g/l
KCI	5,4 mM	0,400 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,3 mM	0,185 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,8 mM	0,200 g/l
KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,060 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,3 mM	0,060 g/l
NaHCO ₃	4,2 mM	0,350 g/l
D-Glucose x H ₂ O	5,0 mM	0,991 g/l

Die Lösung wurde mit Carbogen äquilibriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

HBSS, modifiziert, ohne NaCl

HBSS ohne NaCl wurde wie HBSS angesetzt, jedoch ohne Zugabe von NaCl. Die Lösung wurde ausschließlich zum Ansetzen der Nycodenz-Stammlösung verwendet.

Präperfusionsmedium		
Hanks' Balanced Salt Solution (HB	SS)	500 ml
Perfusionsmedium I		
Pronase E	0,5% (w/v)	500 mg
ad 100 ml HBSS.		
Das Medium wurde kurz vor der Pe	erfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7	,4 eingestellt und die
Lösung durch einen 0,4 µm-Filter	sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die	Lösung auf 37°C im
Wasserbad erwärmt.		
Perfusionsmedium II		

Collagenase H	0,0143% (w/v)	10 mg
DNase I	0,0014% (w/v)	1 mg
ad 70 ml HBSS.		

Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Enzym-Inkubationsmedium

Pronase E	0,10% (w/v)	100 mg
DNase I	0,01% (w/v)	10 mg
ad 100 ml HBSS.		

Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Nycodenz-StammlösungNycodenz28,7% (w/v)287 g/lNycodenz wurde in ca. 60 ml HBSS ohne NaCl gelöst und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf7,4 eingestellt. Der Ansatz wurde auf 100 ml aufgefüllt. Die Dichte der Lösung wurde mitHilfe eines Refraktometers kontrolliert. Die Nycodenzlösung wurde durch einen 0,4 µm-Filtersterilfiltriert und in sterilen 50 ml-Polypropylenröhrchen bei 4°C gelagert.

Medium RPMI 1640		
RPMI 1640 Pulvermedium		
ohne NaHCO3		10,42 g/l
mit D-Glucose x H ₂ O	10,1 mMI	2,00 g/l
HEPES	30,0 mMI	7,12 g/l
NaHCO3	23,8 mMI	2,00 g/l

Das Medium wurde mit Carbogen äquilibriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Antibiotika)

Die Zusammensetzung der Penicillin-Streptomycin-Lösung ist unter 3.1.1 beschrieben.

RPMI-Kulturmedium		
NCS	30% (v/v)	30 ml
Antibiotika	1% (v/v)	1 ml
ad 100 ml Medium RPMI 1640.		

Medium 199 (M199)

Die Zusammensetzung des Mediums 199 ist unter 3.1.1 beschrieben.

M199-Kulturmedium II		
NCS	30% (v/v)	30 ml
Antibiotika	1% (v/v)	1 ml
ad 100 ml Medium M199.		

3.2.2 Nicht-rezirkulierende *in situ*-Perfusion der Rattenleber zur Isolierung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen

Die Perfusion wurde wie unter 3.1.2 beschrieben angelegt. Zusätzlich zur Ligatur um die *Vena portae* cranial der *Vena lienalis* wurde eine Ligatur um die *Vena cava* caudalis zwischen der Leber und den *Venae renales* vorbereitet. Nachdem die *Vena cava caudalis* durchtrennt, eine Braunüle in die *Vena portae* gelegt wurde und die Leber blutleer gespült war, wurde die Braunüle fixiert. Cranial der Leber wurde die *Vena cava caudalis* mit einer Ligatur verschlossen. Die Perfusion erfolgte mit HBSS mit einer konstanten Pumpgeschwindigkeit von 30-40 ml/min und einem Druck von 45 cm Wassersäule. Die HBSS wurde mittels eines Rückflußkühlers, der gleichzeitig als Blasenfalle diente, auf 37°C temperiert, jedoch während der Perfusion nicht mit Carbogen begast. Die Leber wurde auf einem Parafilmstreifen gelagert und zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm abgedeckt. Am Ende der Präperfusion wurde die Pumpgeschwindigkeit auf 10 ml/min reduziert und die Leber mit Perfusionsmedium I offen perfundiert, bis die 100 ml Perfusionsmedium verbraucht waren.

3.2.3 Rezirkulierende in situ-Perfusion und Inkubation der groben Zellsuspension

Im Anschluß an die Perfusion mit Perfusionsmedium I wurde die Leber mit einer Flußgeschwindigkeit von 10 ml/min mit 70 ml Perfusionsmedium II zunächst 3 min offen, dann 10-15 min rezirkulierend perfundiert. Wenn die Leber hinreichend verdaut war (sichtbar beginnende Aufhebung des Zellverbandes) wurde die freipräparierte Leber in eine Glasschale mit ca. 20 ml Enzym-Inkubationsmedium überführt und die Leberkapsel mit einer Pinzette und Braunüle innerhalb von 5 min vorsichtig zerrissen. Die grobe Zellsuspension wurde in einen mit einem Metallring beschwerten 200 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben überführt und das restliche Enzym-Inkubationsmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in einem auf 37°C temperierten Wasserbad auf einem Magnetrührer gerührt. Über eine Glas-Elektrode wurde der pH-Wert kontrolliert und mit steriler 1 N NaOH auf 7,35-7,45 eingestellt. Die Inkubation wurde beendet, wenn der pH-Wert sich bei 7,40 stabilisierte, in der Regel nach ca. 10-15 min. Die Zellsuspension wurde anschließend zum Entfernen von Bindegewebsresten und größerer Zellverbände durch Nylongaze (Porengröße 60 µm) in vier 50 ml-Polypropylenröhrchen filtriert und mit 4°C kalter HBSS aufgefüllt.

3.2.4 Reinigung der Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte

Bei dem Verfahren wurden die Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen aus der Leberzellsuspension in einem einstufigen Dichtegradienten und anschließend durch zentrifugale Elutriation voneinander getrennt.

Alle folgenden Schritte wurden mit auf Eis gelagerten Lösungen durchgeführt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 380 x g (1850 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in HBSS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in einem 50 ml-Polypropylenröhrchen vereinigt, mit HBSS aufgefüllt und wiederum 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt, die Zellen in 10 ml HBSS resuspendiert und bei Schlierenbildung ggf. mit 1 mg DNase I versetzt. Diese 10 ml Nichtparenchymzellsuspension wurden mit 14 ml 28,7% (w/v) Nycodenz-Lösung gemischt. Die Nycodenz-Endkonzentration betrug 16,74% (w/v). In zwei 30 ml-Corex-Zentrifugenröhrchen wurden je 10 ml HBSS vorgelegt und mit 12 ml dieser mit Nycodenz versetzten Zellsuspension über eine 10 ml-Spritze mit Kanüle, die bis auf den Boden des Corex-Röhrchens reichte, unterschichtet. Der Gradient wurde 16 min bei 1050 x q (3250 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Dabei wurde die Geschwindigkeit der Zentrifuge langsam erhöht und die Bremse ausgestellt. Während der Zentrifugation wanderten die Zellen mit einer geringeren Dichte als 16,74% (w/v) nach oben und die übrigen Zellen mit einer höheren Dichte nach unten und somit auf den Boden des Corex-Röhrchens. Die Bande, die sich an der Grenzschicht zwischen Nycodenz und HBSS gebildet hatte und die unter anderem Kupffer- und sinusoidale Endothelzellen enthielt, wurde mit einer Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und in 50 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellen wurden in eiskaltem RPMI resuspendiert, mit diesem Medium auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 380 x q (1850 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Die Kupfferund sinusoidalen Endothelzellen wurden in 5 ml eiskaltem RPMI resuspendiert und durch zentrifugale Elutriation voneinander getrennt.

3.2.5 Trennung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte durch zentrifugale Elutriation

Bei der zentrifugalen Elutriation werden Partikel auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte und Größe getrennt. Der Rotor der Elutriationszentrifuge enthält eine Trennkammer, die entgegen der Zentrifugalkraft von Medium durchflossen wird. Dadurch wirken auf in der Kammer befindliche Partikel zwei gegeneinander gerichtete Kräfte: die durch die Rotationsgeschwindigkeit beeinflußbare Zentrifugalkraft und die durch eine vorgeschaltete Pumpe regulierbare Flußgeschwindigkeit, welche in der Kammer zentripetal gerichtet ist. Durch die trapezoide Form der Trennkammer nimmt zentral nicht nur die Zentrifugalkraft, sondern auch die Flußrate bis zu einer Abrißkante ab, wodurch die Trenneffizienz verbessert wird. Die Partikel ordnen sich in der Kammer im Gleichgewicht der Kräfte entsprechend ihrer Dichte und Größe in verschiedenen Schichten an. Durch die gezielte Änderung der Flußgeschwindigkeit kann man diese Schichten selektiv elutriieren. Bei bekannter Dichte und Größe der jeweiligen Partikel kann man in Abhängigkeit von der Flußgeschwindigkeit (F) die

Sedimentationsgeschwindigkeit (V) der zu trennenden Partikel in der Kammer nach folgender Formel berechnen:

V = F / A	= [d² (δ _p – δ _m) / 18 η] ω² r	Stoke'sches Gesetz
А	Querschnittsfläche der Trennka	mmer
F	Flußgeschwindigkeit	
d	Durchmesser der Partikel	
δ _p , δ _m	Dichte: p, Partikel; m, Medium	
η	Viskosität des Mediums	
ω	Winkelgeschwindigkeit der Zent	rifuge
r	Radiale Position der Partikel (At	ostand von der Rotationsachse)

Wenn die Zentrifugalkraft, die auf die Zelle wirkt, der Kraft gleicht, die durch den Gegenfluß erzeugt wird, befinden sich die Zellen im Gleichgewicht und V = 0 für alle Zellen. Wie aus der Gleichung hervorgeht, ist die Position jeder Zelle in der Trennkammer abhängig von ihrer Größe und Dichte. Es findet keine Sedimentation ("Pelletierung") der Zellen statt (Abb. 7).



Abb. 7: Verhalten von Zellen in der Standard-Trennkammer während der zentrifugalen Elutriation. (1) In Medium suspendierte Zellen gelangen nach Größe, Form und Dichte ungeordnet in die Trennkammer. (2) Jede Zelle befindet sich innerhalb der Kammer an der Stelle, an der die Zentrifugalkraft und die durch den Gegenfluß erzeugte Kraft gleich sind. Die Position jeder Zelle wird jetzt determiniert durch ihre Größe, Form und Dichte. (3) Die einzelnen Zellfraktionen werden durch Erhöhung der Flußrate aus der Zellkammer elutriiert, wobei die Zellen mit zunehmender Größe/Dichte aus der Kammer gespült werden.

Die einzelnen Zellfraktionen werden durch eine Erhöhung der Flußrate oder eine Reduktion der Zentrifugalkraft aus der Trennkammer eluiert. In dieser Arbeit wurden Kupffer- und

3. Methoden

sinusoidale Endothelzellen durch eine Erhöhung der Flußrate eluiert. Die Trennung erfolgte in einer Standardkammer. In Abbildung 8 ist das Elutriationssystem schematisch dargestellt. Die Kupffer- und sinudoidalen Endothelzellen wurden in 5 ml RPMI resuspendiert, mit einer Spritze aufgezogen und bei einer Pumpgeschwindigkeit von 7,0 ml/min über das Injektionsventil eingespritzt. Leukocyten, Erythrocyten und Debris wurden bei einer Pumpgeschwindigkeit von 12,5 ml/min elutriiert (300 ml), gefolgt von sinusoidalen Endothelzellen bei 18,0 ml/min und 22,0 ml/min (200 ml), einer Mischfraktion aus sinusoidalen Endothel- und Kupfferzellen bei 26,0 ml/min (50 ml) und den Kupfferzellen bei 35,0 ml/min und 45,0 ml/min (250 ml). Die Zellfraktionen wurden in 50 ml-Polypropylenröhrchen aufgefangen und die 50 ml-Röhrchen, die Kupfferzellen und sinusoidale Endothelzellen enthielten, 10 min bei 4°C und 380 x g (1850 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Kupffer- und Endothelzellfraktionen in jeweils ein 50 ml-Polypropylenröhrchen überführt und nochmals in RPMI resuspendiert und zentrifugiert. Das Kupfferzellsediment wurde in 5 ml RPMI-Kulturmedium, das Endothelzellsediment in 5 ml M199-Kulturmedium II resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Pumpgeschwindigkeit	Elutriationsvolumen	Elutriierte Zellen
(ml/min)	(ml)	
12,5 ml/min	300 ml	Leukocyten, Erythrocyten
		und Zelltrümmer
18,0 ml/min	100 ml	Sinusoidale Endothelzellen
22,0 ml/min	100 ml	Sinusoidale Endothelzellen
26,0 ml/min	50 ml	Sinusoidale Endothel-
		und Kupfferzellen
35,0 ml/min	100 ml	Kupfferzellen
45,0 ml/min	150 ml	Kupfferzellen

Tab. 4: Elutriationsschema.

3.2.6 Mikroskopische Zellzählung

Die Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen wurden wie unter 3.1.5 beschrieben in RPMI ausgezählt.



Abb. 8: Schematische Darstellung des Elutriatiorsystems. Dargestellt ist das Zubehör innerhalb und außerhalb der Elutriationszentrifuge. Das Elutriationsmedium wird aus dem Vorratsgefäß (A) über eine peristaltische Pumpe (B) unter Beobachtung des Drucks mittels eines Manometers (C) durch eine Blasenfalle (D) in die Kammer der Elutriationszentrifuge (E) geleitet. Vor der Blasenfalle können Zellen über einen Dreiwegehahn injiziert werden und gelangen so zusammen mit Elutriationsmedium in die Trennkammer. Durch Erhöhung der Flußrate elutrileren die Zellen aus dem Rotor in Auffanggefäße (F). Über eine Stroboskoplampe (nicht dargestellt) kann die Trennkammer beobachtet werden.

3.2.7 Herstellung Collagen-beschichteter Zellkulturplatten

Herstellung der Collagen-Lösung

Rattenschwänze von bis zu 250 g schweren Ratten wurden bei –20°C aufbewahrt. Ca. 20 Schwänze wurden in 70% (v/v) Ethanol gereinigt, danach wurde die Haut abgezogen und die Collagenfasern von der Schwanzspitze beginnend mit einer Zange durch Herausbrechen der Wirbel aus dem Bindegewebe gezogen. Die möglichst blutfreien Fasern wurden 4 h unter einer Lampe getrocknet, in 2 cm lange Stückchen geschnitten und über Nacht in Aluminiumschälchen unter UV-Licht sterilisiert.

Je 0,5 g Fasern wurden in sterilen 250 ml-Flaschen mit 200-220 ml 0,05% (v/v) Essigsäure mindestens 24 h bei 4°C gerührt. Die Suspension wurde in der Sorvall RC 5B-Zentrifuge im GSA-Rotor bei 3750 x g (6000 rpm) 1-2 h bei 4°C zentrifugiert, der zähflüssige Überstand in sterile Flaschen überführt und für maximal ein Jahr bei 4°C gelagert.

Beschichtung der Zellkulturplatten

Zellkulturplatten wurden mit 1 ml Collagen-Lösung benetzt, davon wurden ca. 900 µl wieder abgenommen und das verbleibende Collagen in den geöffneten Zellkulturplatten unter der Sterilbank über Nacht getrocknet. Die Zellkulturplatten konnten bei Raumtemperatur 1-2 Monate aufbewahrt werden.

3.2.8 Kultivierung von Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen der Ratte

Sinusoidale Endothelzellen wurden auf Collagen-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Es wurden 4 x 10⁶ Kupfferzellen bzw. 8 x 10⁶ sinusoidale Endothelzellen für die RNA-Isolierung auf 35 mm-Zellkulturschalen und 1 x 10⁶ Kupfferzellen bzw. 2 x 10⁶ sinusoidale Endothelzellen pro Vertiefung einer 24-Wellplatte für die cAMP-Bestimmung in RPMI-Kulturmedium bzw. M199-Kulturmedium II ausplattiert und 72 h in Begasungsbrutschränken bei einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂ bei 37°C bis zum Experiment kultiviert.

3.3 Isolierung, Reinigung und Kultivierung von Kupfferzellen der Maus

3.3.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit pyrogenfreiem Ampuwa- H_2O angesetzt, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4°C gelagert.

3. Methoden

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

HBSS wurde wie unter 3.2.1 beschrieben mit pyrogenfreiem Ampuwa-H₂O angesetzt.

HBSS, modifiziert, ohne NaCl

HBSS ohne NaCl wurde wie unter 3.2.1 beschrieben mit pyrogenfreiem Ampuwa-H₂O angesetzt.

Präperfusionsmedium

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	500 ml

Perfusionsmedium I

 Pronase E
 0,4% (w/v)
 100 mg

 ad 25 ml HBSS.
 100 mg

Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Perfusionsmedium II

Collagenase H	0,0143% (w/v)	5 mg
DNase I	0,0014% (w/v)	0,5 mg
ad 35 ml HBSS.		

Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Enzym-Inkubationsmedium

Pronase E	0,1% (w/v)	25 mg
DNase I	0,01% (w/v)	2,5 mg
ad 25 ml HBSS.		

Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Nycodenz-Stammlösung

Die Nycodenz-Stammlösung wurde wie unter 3.2.1 beschrieben mit HBSS aus pyrogenfreiem Ampuwa-H₂O angesetzt.

Medium RPMI 1640

Das Medium RPMI 1640 wurde als Fertigmedium von der Firma GibcoBRL bezogen (Katalog-Nr. 42402-024).

RPMI-Kulturmedium

Das RPMI-Kulturmediums wurde wie unter 3.2.1 beschrieben mit RPMI 1640-Fertigmedium, Endotoxin-freiem NCS und Endotoxin-freier Antibiotika-Lösung angesetzt.

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Antibiotika)

Die Endotoxin-freie Antibiotika-Lösung wurde von der Firma GibcoBRL bezogen (Katalog-Nr. 15240-096).

3.3.2 Nicht-rezirkulierende *in situ*-Perfusion der Mausleber und Inkubation der groben Zellsuspension

Die Perfusion wurde wie unter 3.1.2 beschrieben angelegt. Nachdem die *Vena cava caudalis* durchtrennt war, wurde die Leber über eine in der *Vena portae* fixierten Braunüle blutleer gespült. Die Perfusion erfolgte mit HBSS mit einer konstanten Pumpgeschwindigkeit von 10 ml/min und einem Druck von 45 cm Wassersäule. Die HBSS wurde mittels eines Rückflußkühlers auf 37°C temperiert, jedoch während der Perfusion nicht mit Carbogen begast. Die Leber wurde zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm abgedeckt. Am Ende der Präperfusion wurde die Pumpgeschwindigkeit auf 2,5 ml/min reduziert und die Leber mit Perfusionsmedium I offen perfundiert, bis die 25 ml Perfusionsmedium I verbraucht waren.

Im Anschluß an die Perfusion mit Perfusionsmedium I wurde die Leber mit einer Flußgeschwindigkeit von 2,5 ml/min mit 35 ml Perfusionsmedium II offen weiterperfundiert. Am Ende der Perfusion wurde die Leber freipräpariert und in eine Glasschale mit ca. 10 ml Enzym-Inkubationsmedium überführt. Die Leberkapsel wurde mit einer Pinzette und Braunüle innerhalb von 5 min vorsichtig zerrissen. Die grobe Zellsuspension wurde in einen 50 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben überführt und das restliche Enzym-Inkubationsmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in einem auf 37°C temperierten Wasserbad auf einem Magnetrührer gerührt. Über eine Glas-Elektrode wurde der pH-Wert kontrolliert und mit steriler 1 N NaOH auf 7,35-7,45 eingestellt. Die Inkubation wurde beendet, wenn der pH-Wert sich bei 7,40 stabilisierte, in der Regel nach ca. 10-15 min. Die Zellsuspension wurde anschließend zum Entfernen von Bindegewebsresten und größerer Zellverbände durch Nylongaze (Porengröße 60 µm) in zwei 50 ml-Polypropylenröhrchen filtriert und mit 4°C kalter HBSS aufgefüllt.

3.3.3 Reinigung von Kupfferzellen der Maus durch einen zweistufigen Nycodenz-Dichtegradienten

Bei dem Verfahren wurden die Kupfferzellen aus der Leberzellsuspension in einem zweistufigen Dichtegradienten von den anderen Nichtparenchymzellen getrennt.

Alle folgenden Schritte wurden mit auf Eis gelagerten Lösungen durchgeführt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 380 x g (1850 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in HBSS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in einem 50 ml-Polypropylenröhrchen vereinigt, mit HBSS aufgefüllt und wiederum 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt, die Zellen in 2,5 ml HBSS resuspendiert und bei Schlierenbildung ggf. mit 1 mg DNase I versetzt. Diese 2,5 ml Nichtparenchymzellsuspension wurde mit 1,554 ml 28,7% (w/v) Nycodenz-Lösung gemischt. Die Nycodenz-Endkonzentration betrug 11% (w/v). 4 ml einer 18% (w/v) Nycodenzlösung wurden durch Mischen von 1,491 ml HBSS und 2,509 ml 28,7% (w/v) Nycodenzlösung hergestellt und in einem 15 ml-Polypropylenröhrchen vorgelegt. Die 4 ml mit Nycodenz versetzte Zellsuspension wurden vorsichtig mit einer Pipette über die 18% (w/v) Nycodenzlösung geschichtet. Anschließend wurden 4 ml HBSS über die 11% (w/v) Nycodenz-Zellsuspension-Lösung geschichtet. Der Gradient wurde 45 min bei 1050 x g (3250 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Dabei wurde die Geschwindigkeit der Zentrifuge langsam erhöht und die Bremse ausgestellt. Während der Zentrifugation wanderten die Kupfferzellen in die Interphase zwischen der 18% (w/v) und 11% (w/v) Nycodenzlösung, während sich die Endothelzellen in der Interphase zwischen 11% (w/v) Nycodenzlösung und HBSS anreicherten. Nach der Zentrifugation wurde die Kupfferzell-haltige Schicht vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Die Kupfferzellen wurden in RPMI resuspendiert, mit diesem Medium auf 15 ml aufgefüllt und 10 min bei 380 x g (1850 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Die Kupfferzellen wurden in 2 ml RPMI-Kulturmedium resuspendiert und gezählt.

3.3.4 Mikroskopische Zellzählung

Die Kupfferzellen der Maus wurden wie unter 3.1.5 beschrieben in RPMI ausgezählt.

3.3.5 Kultivierung von Kupfferzellen der Maus

Es wurden 1 x 10^6 Maus-Kupfferzellen pro Vertiefung einer 24-Wellplatte in RPMI-Kulturmedium ausplattiert und 48 h in Begasungsbrutschränken in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂ bei 37°C bis zum Experiment kultiviert.

3.4 Isolierung, Reinigung und Kultivierung von Perisinusoidalzellen der Ratte

3.4.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H_2O angesetzt, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4°C gelagert.

Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freies	Präperfusionsmedium

NaCl	137 mM	8,0 g/l
KCI	5,4 mM	0,4 g/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,6 mM	0,08 g/l
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	0,8 mM	0,14 g/l
HEPES	10 mM	2,38 g/l
EGTA	0,5 mM	0,19 g/l
NaHCO ₃	4,2 mM	0,35 g/l
D-Glucose x H ₂ O	5 mM	0,991 g/l

Das Medium wurde mit Carbogen äquilibriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Enzymlösung für Perfusion		
NaCl	137 mM	8,0 g/l
KCI	5,4 mM	0,4 g/l
CaCl ₂	3,8 mM	0,56 g/l
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,8 mM	0,08 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,8 mM	0,14 g/l
HEPES	10 mM	2,38 g/l
NaHCO ₃	4,2 mM	0,35 g/l

Das Medium wurde mit Carbogen äquilibriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Perfusionsmedium I			
Pronase E	0,1% (w/v)	100 mg	

ad 100 ml Enzymlösung.

Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und durch einen 0,4 μ m-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Perfusionsmedium II

Collagenase H 0,04% (w/v) 80 mg ad 200 ml Enzymlösung. Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im

Wasserbad erwärmt.

Enzym-Inkubationsmedium

0,08% (w/v)	80 mg
0,05% (w/v)	50 mg
0,001% (w/v)	1 mg
	0,08% (w/v) 0,05% (w/v) 0,001% (w/v)

ad 100 ml Enzymlösung.

Das Medium wurde kurz vor der Perfusion angesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Nycodenz-Stammlösung

Die Zusammensetzung der Nycodenz-Stammlösung ist unter 3.2.1 beschrieben.

Medium RPMI 1640

Die Zusammensetzung des Mediums RPMI 1640 ist unter 3.2.1 beschrieben.

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Antibiotika)

Die Zusammensetzung der Penicillin-Streptomycin-Lösung ist unter 3.1.1 beschrieben.

RPMI-Kulturmedium

Die Zusammensetzung des RPMI-Kulturmediums ist unter 3.2.1 beschrieben.

3.4.2 Nicht-rezirkulierende *in situ*-Perfusion der Rattenleber und Inkubation der groben Zellsuspension

Die Perfusion wurde wie unter 3.1.2 beschrieben angelegt, erfolgte jedoch mit dem durch einen Rückflußkühler auf 37°C temperierten Ca²⁺/Mg²⁺-freien Präperfusionsmedium. Nachdem die Leber blutleer gespült war, wurde für 10 min mit diesem Medium bei einer Pumpgeschwindigkeit von 10 ml/min weiterperfundiert. Im Anschluß daran wurde die Leber für 8 min mit Perfusionsmedium I perfundiert und danach für 20 min mit Perfusionsmedium II. Innerhalb dieser Zeit wurde die Leber aus dem Abdomen freipräpariert. Die freipräparierte Leber wurde in eine Glasschale, die mit ca. 20 ml Enzym-Inkubationsmedium gefüllt war,

überführt und die Leberkapsel mit einer Pinzette und einer Braunüle geöffnet. Die Zellen wurden herausgeschüttelt und das restliche Enzym-Inkubationsmedium dazugegeben.

Die grobe Zellsuspension wurde in einen mit einem Metallring beschwerten 200 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben überführt und das restliche Enzym-Inkubationsmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in einem auf 37°C temperierten Wasserbad auf einem Magnetrührer gerührt. Über eine Elektrode wurde der pH-Wert kontrolliert und mit steriler 1 N NaOH auf 7,35-7,45 eingestellt. Die Inkubation wurde beendet, wenn der pH-Wert sich bei 7,40 stabilisierte, in der Regel nach ca. 10-15 min.

3.4.3 Reinigung von Perisinusoidalzellen der Ratte

Die Zellsuspension wurde zum Entfernen von Bindegewebsresten und größerer Zellverbände durch eine Nylongaze in vier 50 ml-Polypropylenröhrchen filtriert und mit 4°C kalter HBSS aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 250 x g (1650 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in ca. 5 ml HBSS resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Polypropylenröhrchen vereinigt, mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und wiederum für 10 min bei 250 x g (1650 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt, die Zellen mit 1 mg DNase I versetzt, mit HBSS auf ein Volumen von 28 ml aufgefüllt und mit 11,5 ml Nycodenz (28,7% (w/v)) gemischt. Die Nycodenz-Endkonzentration betrug 8,13% (w/v). Es wurden je 10 ml HBSS in 30 ml-Corex-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit je 20 ml dieser mit Nycodenz versetzten Zellsuspension über eine 10 ml-Spritze mit Kanüle, die bis auf den Boden des Corex-Röhrchens reichte, unterschichtet. Der Gradient wurde 20 min bei 800 x g (2850 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Dabei wurde die Geschwindigkeit der Zentrifuge langsam und gleichmäßig erhöht, bis die Endgeschwindigkeit erreicht war. Auch bei diesem Zentrifugationsschritt wurde die Bremse ausgestellt. Während der Zentrifugation wanderten die Zellen, die eine Dichte von 8,13% oder weniger haben, nach oben, und die übrigen Zellen mit einer höheren Dichte nach unten und somit auf den Boden des Corex-Röhrchens. Die Bande, die sich an der Grenzschicht zwischen Nycodenz und HBSS gebildet hatte und die die Perisinusoidalzellen enthielt, wurde mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und in ein 50 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellen wurden in HBSS resuspendiert, mit diesem Medium auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 250 x g (1650 rpm, Sigma 3E-1-Zentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Die Perisinusoidalzellen wurden in 5 ml HBSS resuspendiert und ausgezählt.

3.4.4 Mikroskopische Zellzählung

Die Perisinusoidalzellen wurden wie unter 3.1.5 beschrieben in RPMI ausgezählt und eine mögliche Kontamination durch andere Nichtparenchymzellen mikroskopisch durch die den Perisinusoidalzellen charakteristischen Fetteinlagerungen bestimmt.

3.4.5 Kultivierung von Perisinusoidalzellen der Ratte

Es wurden 1,5 x 10⁶ Perisinusoidalzellen für die RNA-Isolierung auf 35 mm-Zellkulturschalen bzw. 5 x 10⁵ Perisinusoidalzellen pro Vertiefung einer 24-Wellplatte für die cAMP-Bestimmung in RPMI-Kulturmedium ausplattiert. Die Perisinusoidalzellen wurden 48 h bis zum Experiment kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken bei einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂ bei 37°C.

3.5 Zellkulturversuche

3.5.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H_2O angesetzt, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4°C gelagert.

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

Die Zusammensetzung der HBSS ist unter 3.2.1 beschrieben.

Inkubationsmedium (HEPES-g	epuffertes HBSS)	
HEPES	20 mM	2,385 g
ad 500 ml HBSS.		
Der pH der Lösung wurde au	f 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde durcl	h einen 0,2 µm-Filter
sterilfiltriert und bei 4°C in auto	klavierten Glasflaschen gelagert.	
<u>PBS</u>		
NaCl	137 mM	80,06 g/l
KCI	2,7 mM	2,01 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	2,05 g/l
Na₂HPO₄	8,0 mM	11,36 g/l

Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung bei 4°C gelagert.

Pefabloc-StammlösungPefabloc200 mM2,3 g/50 ml

Pefabloc wurde in H_2O gelöst und in Aliquots bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

Leupeptin-Stammlösung

Leupeptin wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in H_2O gelöst und bei –20°C gelagert.

Benzamidin-Stammlösung

Benzamidin wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in H₂O gelöst und bei –20°C gelagert.

Lysispuffer A		
Tris	20 mM	2,47 g/l
NaCl	137 mM	8,0 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mM	1,02 g/l
Nonidet P-40	1% (v/v)	10 ml/l
Glycerol	10% (v/v)	100 ml
EDTA	5 mM	1,86 g/l
NaF	1 mM	42 mg/l

Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und bei 4°C gelagert.

Für 100 ml Lysispuffer wurden frisch hinzugefügt:

Pefabloc	0,2 mM	100 µl 200 mM Stlsg
Leupeptin	10 µg/ml	100 µl 10 mg/ml Stlsg
Benzamidin	10 µg/ml	100 µl 10 mg/ml Stlsg

L١	/sisp	ouffer	В

Tris	10 mM	1,24 g/l
NaCl	137 mM	8,0 g/l
Natriumdeoxycholat	1% (w/v)	10 g/l
Nonidet P-40	1% (v/v)	10 ml/l
EDTA	5 mM	1,86 g/l
NaF	1 mM	42 mg/l

Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und bei 4°C gelagert. Für 100 ml Lysispuffer wurden frisch hinzugefügt:

Pefabloc	0,2 mM	100 µl 200 mM Stlsg
Leupeptin	10 µg/ml	100 µl 10 mg/ml Stlsg
Benzamidin	10 µg/ml	100 µl 10 mg/ml Stlsg

Forskolin-Stammlösung

Forskolin wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei –20°C gelagert.

IBMX-Stammlösung

IBMX wurde in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei –20°C gelagert.

lloprost-Stammlösung

lloprost war in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in H₂O gelöst und wurde bei 4°C gelagert.

Indomethacin-Stammlösung

Indomethacin wurde in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei –20°C gelagert.

Interleukin-6-Stammlösung

IL-6 wurde in einer Konzentration von 50 μ g/ml in H₂O gelöst und in Aliquots bei –70°C gelagert.

Lipopolysaccharid-Stammlösung

LPS aus *E. coli*, Serotyp O55:B5 wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in sterilem H_2O gelöst und bei 4°C gelagert.

ONO613- und ONO604-Stammlösungen

Der EP2-R-Agonist (ONO613) und der EP4-R-Agonist (ONO604) wurden in einer Konzentration von 10 mM in 70% (v/v) Ethanol gelöst und bei –20°C gelagert. Vor dem Versuch wurde das Ethanol verdampft und die Agonisten in Medium aufgenommen.

Pertussistoxin-Stammlösung

Pertussistoxin wurde in einer Konzentration von 50 μ g/ml in H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

PGE2- und PGD2-Stammlösung

 PGE_2 und PGD_2 wurden in einer Konzentration von 10 mM in 70% (v/v) Ethanol gelöst und in Aliquots bei –20°C gelagert. Vor dem Versuch wurde das Ethanol verdampft und die Substanzen in Medium aufgenommen.

Rp-cAMPS-Stammlösung

Rp-cAMPS wurde in einer Konzentration von 10 mM in H₂O gelöst und in Aliquots bei –20°C gelagert. Rp-cAMPS ist ein starker und spezifischer kompetitiver Inhibitor der Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) durch cAMP.

3.5.2 Zellkulturversuche zum funktionellen Nachweis G_S- und G_i-Protein-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Nichtparenchymzellen der Ratte

Für den funktionellen Nachweis G_S- und G_i-Protein-gekoppelter Prostanoidrezeptoren auf Nichtparenchymzellen der Ratte wurden Kupfferzellen, sinusoidale Endothelzellen sowie Perisinusoidalzellen wie unter 3.2 und 3.4 beschrieben isoliert und in folgender Zellzahl auf 24-Well-Kulturplatten vor dem Zellversuch für die angegebenen Zeiten kultiviert.

Zelltyp	Zellzahl	Kulturdauer	Medium
Kupfferzellen:	1 x 10 ⁶ Zellen/Well	72 h	RPMI-Kulturmedium
Sinusoidale	2 x 10 ⁶ Zellen/Well	72 h	M199-Kulturmedium II
Endothelzellen:			
Perisinusoidalzellen:	0,5 x 10 ⁶ Zellen/Well	48 h	RPMI-Kulturmedium

Für den Nachweis des G_i-gekoppelten EP3-Rezeptors wurden Kupfferzellen und sinusoidale Endothelzellen nach insgesamt 48 h und Perisinusoidalzellen nach insgesamt 24 h zusätzlich für weitere 24 h mit 100 ng/ml Pertussistoxin vorbehandelt. Pertussistoxin katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des G_i-Proteins, wodurch die GDP-Freisetzung inhibiert und somit das G_i-Protein in seiner inaktiven Form arretiert wird.

Die so kultivierten Zellen wurden zweimal mit Inkubationsmedium gewaschen, 10 min bei 37°C mit 200 μ l Inkubationsmedium mit 1 mM IBMX vorinkubiert und dann für 5 min mit PGE₂, PGD₂, Iloprost oder den EP2-R- bzw. EP4-R-spezifischen Agonisten ONO613 bzw. ONO604 stimuliert. Nach genau 5 min wurde das Inkubationsmedium abgenommen, die Zellen mit 200 μ l eiskaltem 65% (v/v) Ethanol überschichtet, auf Eis abgekratzt und die Flüssigkeit vollständig in der Vakkuumzentrifuge abgedampft. Das Sediment wurde in 300 μ l cAMP-RIA-Puffer gelöst und davon 50 μ l unverdünnt in den cAMP-RIA eingesetzt (siehe 3.6).

3.5.3 Zellkulturversuche zur Induktion der mRNA-Expression und zum funktionellen Nachweis Ga-Protein-gekonnelter Prostanoidrezentoren in Henatocyten der Patte

. Nachweis G_S-Protein-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten der Ratte durch IL-6

Hepatocyten wurden wie unter 3.1 beschrieben isoliert und für die Isolation von RNA auf 60 mm-Zellkulturschalen bzw. für die funktionellen Analysen auf 35 mm-Kulturschalen kultiviert.

Zeitabhängigkeit

Hepatocyten wurden für 43 h, 42 h, 40 h, 36 h und 24 h in M199-Kulturmedium I kultiviert, bevor 100 ng/ml IL-6 dem Kulturmedium hinzugefügt wurde. Die Kultur wurde in der Anwesenheit von IL-6 für 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 20 h bis insgesamt 44 h weitergeführt. Anschließend wurden die Hepatocyten für die Isolierung von Gesamt-RNA zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen bei –70°C bis zur RNA-Isolierung (siehe 3.11) aufbewahrt.

Für den funktionellen Nachweis der Induktion G_s -Protein-gekoppelter Prostanoidrezeptoren durch IL-6 wurden die mit IL-6 behandelten Hepatocyten zweimal mit Inkubationsmedium gewaschen, 10 min in Inkubationsmedium mit 1 mM IBMX bei 37°C vorinkubiert und mit 10 μ M PGE₂ oder PGD₂ stimuliert. Nach 2 min wurde das Inkubationsmedium abgenommen, die Zellkulturplatten sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –70°C gelagert. Die bei –70°C gelagerten Zellkulturplatten wurden in flüssigen Stickstoff überführt, in Gruppen von je drei Platten kurz angetaut und mit 500 μ l eiskaltem Aufschlußpuffer überschichtet. Die Platten wurden 1 h bei 4°C auf einer eisgekühlten Aluminiumplatte inkubiert, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt. Das Zellysat wurde dann 10 min bei 2000 x *g* in der Sigma-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellysate wurden 1:20 mit cAMP-RIA-Puffer (siehe 3.6.2) verdünnt. 50 μ l der Vedünnungen wurden in den cAMP-RIA eingesetzt (siehe 3.6).

Dosiswirkung

Hepatocyten wurden wie unter 3.1 beschrieben isoliert und für 36 h kultiviert. Anschließend wurde IL-6 in den Konzentrationen 1,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml den Hepatocyten-Kulturen zugefügt und die Kultur für 8 h weitergeführt. Nach 8 h wurden die Hepatocyten für die Isolierung von Gesamt-RNA zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen bei –70°C bis zur RNA-Isolierung (siehe 3.11) aufbewahrt.

Für den funktionellen Nachweis wurden die Hepatocyten zweimal mit 37°C warmen Inkubationsmedium gewaschen, 10 min bei 37°C in Inkubationsmedium mit 1 mM IBMX vorinkubiert und mit 10 μ M PGE₂ oder PGD₂ stimuliert. Nach 2 min wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellkulturplatten sofort in flüssigen Stickstoff

überführt. Die weitere Aufarbeitung der Proben für den cAMP-RIA wurde wie unter *Zeitabhängigkeit* beschrieben durchgeführt.

Funktioneller Nachweis des EP3-R in IL-6-behandelten Hepatocyten

Hepatocyten wurden wie unter 3.1 beschrieben isoliert und auf 35 mm-Zellkulturschalen in M199-Kulturmedium I für 36 h kultiviert. Danach wurde die Kultur mit 100 ng/ml IL-6 in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 100 ng/ml Pertussistoxin für 8 h weitergeführt. Anschließend wurden die Hepatocyten zweimal mit 37°C warmen Inkubationsmedium gewaschen, 10 min bei 37°C in Inkubationsmedium mit 1 mM IBMX vorinkubiert und mit 10 μ M PGE₂ stimuliert. Nach 2 min wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellkulturplatten sofort in flüssigen Stickstoff überführt.

Die weitere Aufarbeitung der Proben für den cAMP-RIA wurde wie unter *Zeitabhängigkeit* beschrieben durchgeführt.

Funktioneller Nachweis der Induktion G_S-gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in Hepatocyten IL-6-behandelter Ratten

Milena Koleva stellte freundlicherweise Hepatocyten zur Verfügung, die wie unter 3.1 beschrieben aus Ratten isoliert wurden, die 8 h vor der Zellpräparation intraperitoneal mit 0,02 μ g IL-6/g Körpergewicht behandelt wurden. Die frisch isolierten Hepatocyten wurden einmal mit Inkubationsmedium gewaschen und in einer Dichte von 30 mg/ml in Inkubationsmedium suspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in silikonisierte Glasszintillationsröhrchen überführt und 10 min bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad vorinkubiert. Anschließend wurden die Hepatocyten mit 10 μ M PGE₂ oder PGD₂ stimuliert. Nach 2 min wurden 500 μ I Zellsuspension entnommen und in Schnappdeckel-Reaktionsgefäßen sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Nachdem die Proben aufgetaut waren, wurde zu den 500 μ I Zellsuspension 5 μ I 1N HCI gegeben und die Proben 1 h unter mehrmaligem Mischen auf Eis aufbewahrt. Das Zellysat wurde dann 10 min bei 2000 x g in der Sigma-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt. 50 μ I der Zellysate wurden unverdünnt in den cAMP-RIA eingesetzt (siehe 3.6).

3.5.4 Zellkulturversuche zur Regulation der Expression der mRNA von α_2 -Makroglobulin und der Sekretion des α_2 -Makroglobulin-Proteins in Hepatocyten der Ratte

Nachweis der α_2 -Makroglobulin-mRNA in Hepatocyten

Hepatocyten wurden wie unter 3.1 beschrieben isoliert und auf 60 mm-Zellkulturschalen in M199-Kulturmedium I für 36 h kultiviert. Danach wurden 100 ng/ml IL-6, 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂, 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂ + 10 μ M Rp-cAMPS oder 100 ng/ml IL-6 + 1 μ M Forskolin zu den Hepatocyten-Kulturen gegeben und die Kultur für 8 h fortgeführt.

Anschließend wurden die Hepatocyten zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen bei –70°C bis zur Isolierung von Gesamt-RNA (siehe 3.11) aufbewahrt.

Nachweis des α_2 -Makroglobulins in Zellkulturüberständen von Hepatocyten

Hepatocyten wurden wie unter 3.1 beschrieben isoliert und auf 35 mm-Zellkulturschalen in M199-Kulturmedium I für 36 h kultiviert. Danach wurden die Hepatocyten zweimal mit M199 gewaschen, 100 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂ zu den Hepatocyten-Kulturen gegeben und die Kultur für 8 h fortgeführt. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt und bei –70°C aufbewahrt. Die Überstände wurden für 5 min bei 10 000 x *g* zentrifugiert, in neue Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt und bestimmt (s. 3.9).

3.5.5 Zellkulturversuche zum immunologischen Nachweis der Phosphorylierung von STAT3 in Kernfraktionen und Jak1 in Zellysaten von Hepatocyten der Ratte

Hepatocyten wurden wie unter 3.1 beschrieben isoliert und auf 35 mm-Zellkulturschalen in M199-Kulturmedium I für 36 h kultiviert. Danach wurden die Hepatocytenkulturen für 8 h, 6 h, 4 h, 2 h, 1 h, 45 min, 30 min und 15 min mit 100 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂ bis insgesamt 44 h weitergeführt. Zur Beendigung der Stimulation wurden die Hepatocyten auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellkulturplatten sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –70°C gelagert.

Die bei -70° C gelagerten Zellkulturplatten wurden in flüssigen Stickstoff überführt, in Gruppen von je drei Platten kurz aufgetaut und mit 150 µl Lysispuffer A (STAT3) bzw. 150 µl Lysispuffer B (Jak1) pro Zellkulturschale überschichtet, abgekratzt und in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt. Das Lysat von je drei Zellkulturschalen wurde vereinigt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert. Für den immunologischen Nachweis von STAT3 wurden die Überstände (Cytosolfraktion) abgenommen, die Sedimente (Kernfraktion) viermal mit 200 µl Lysispuffer gewaschen und in 90 µl Lysispuffer A resuspendiert. Anschließend wurde 30 µl 4 x SDS-Probenpuffer, der 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol enthielt, dazugegeben, die Proben 5 min bei 95°C inkubiert und 5 min bei 10 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt und ihr Proteingehalt nach Bradford *et al.* bestimmt (s. 3.9). Für den immunologischen Nachweis von Jak1 wurde das Lysat (Lysispuffer B) ebenfalls zentrifugiert, die Überstände in neue Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt und ihr Proteingehalt nach Bradford *et al.* (siehe 3.9) bestimmt.
3.5.6 Zellkulturversuche zum Nachweis der Modulation der TNF α -Freisetzung aus Maus-Kupfferzellen durch PGE₂

Dosiswirkung der Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung durch PGE₂ in Kupfferzellen der Maus

Kupfferzellen wurden wie unter 3.3 beschrieben aus Kontrollmäusen sowie aus EP2-R- und EP4-R-defizienten Mäusen isoliert und für 72 h wie unter 3.3.5 beschrieben in RPMI-Kulturmedium auf 24-Wellplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml RPMI-Medium gewaschen und in 500 μ l Serum-freiem Medium für 6 h mit 100 ng/ml LPS \pm PGE₂ in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM oder 1 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 10 000 x *g* in der Sigmazentrifuge zentrifugiert und bei –70°C gelagert. 100 μ l der Zellkulturüberstände wurden für die Bestimmung von TNF α in den ELISA (siehe 3.8) eingesetzt.

Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung aus Kontroll-Kupfferzellen sowie aus Kupfferzellen EP2-R- und EP-4-R-defizienter Mäuse

Kupfferzellen wurden wie unter 3.3 beschrieben aus Kontrollmäusen sowie aus EP2-R- und EP4-R-defizienten Mäusen isoliert und für 72 h wie unter 3.3.5 beschrieben in RPMI-Kulturmedium auf 24-Wellplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml Serum-freiem RPMI-Medium gewaschen und in 500 µl Serum-freiem Medium 6 h mit 100 ng/ml LPS, 100 ng/ml LPS + 10 µM Indomethacin, 100 ng/ml LPS + 100 nM PGE₂, 100 ng/ml LPS + 1 µM des EP2-R-Agonisten ONO613 oder 100 ng/ml LPS + 10 nM des Nach EP4-Rezeptor-Agonisten ONO604 inkubiert. der Inkubation wurde der Zellkulturüberstand in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 10 000 x g in der Sigmazentrifuge zentrifugiert, in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -70°C gelagert. 100 µl der Zellkulturüberstände wurden für die Bestimmung von TNF α in den ELISA (siehe 3.8) eingesetzt.

Zeitabhängigkeit der Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung durch PGE₂ in Kupfferzellen der Maus

Kupfferzellen wurden wie unter 3.3 beschrieben aus Kontrollmäusen sowie aus EP2-R- und EP4-R-defizienten Mäusen isoliert und für 72 h wie unter 3.3.5 beschrieben in RPMI-Kulturmedium auf 24-Wellplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml RPMI-Medium gewaschen und in 500 μ l Serum-freiem Medium für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h und 40 h mit 100 ng/ml LPS ± 1 μ M PGE₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 10 000 x *g* in der Sigmazentrifuge zentrifugiert und bei -70° C gelagert. 100 μ l der Zellkulturüberstände wurden für die Bestimmung von TNF α in den ELISA (siehe 3.8) eingesetzt.

> Biochemische Methoden <

3.6 Radioimmunologische Bestimmung von cyclischem Adenosin-3',5'monophosphat (cAMP)

Die Quantifizierung der cAMP-Konzentrationen wurde mit dem [¹²⁵I]cAMP Radioimmunoassay-Kit der Firma Amersham-Pharmacia nach Anweisung des Herstellers in Schnappdeckel-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die eingesetzten Volumina entsprechen der Hälfte der von der Firma angegebenen.

3.6.1 Prinzip

Der hier eingesetzte RIA beruht darauf, daß in der Probe vorhandenes cAMP mit einem der Probe zugesetzten mit [¹²⁵I] radioaktiv-markiertem cAMP um die Bindung an einen im Unterschuß vorhandenen spezifischen Antikörper konkurriert. Je mehr cAMP in der Probe ist, desto weniger radioaktiv-markiertes cAMP kann an den Antikörper gebunden werden. Nach einer Äquilibrierungsphase, in der radioaktives und nichtradioaktives cAMP an den Antikörper binden können, wird der Antikörper mit einem an paramagnetischen Latexkugeln immobilisiertem zweiten Antikörper gefällt und der Überstand mit dem nichtgebundenem radioaktiven cAMP vollständig entfernt. Die im Sediment vorhandene Radioaktivität wird im γ -Zähler quantifiziert und korreliert invers mit der Konzentration von cAMP in der Probe.

3.6.2 Puffer und Lösungen

IBMX-Stammlösung

IBMX wurde in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst und bei –20°C gelagert.

<u>Aufschlußpuffer</u>		
HCI	10 mM	0,5 ml 2 N Stlsg
IBMX	1 mM	1 ml 100 mM Stlsg
ad 100 ml H ₂ O.		

Das IBMX wurde unmittelbar vor Gebrauch dem Aufschlußpuffer zugesetzt.

cAMP-RIA-Puffer	
Acetat	0,05 M
Azid	0,01% (w/v)
Thimerosal	ohne Angabe
pH 5,80	

10 ml der vom Hersteller mitgelieferten konzentrierten Pufferlösung wurden in einen 500 ml-Meßzylinder überführt und mit entmineralisiertem H₂O auf 500 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

[125]]cAMP (Tracer)

Adenosin-3',5'-Phosphorsäure-2'-O-Succinyl-3-[^{125}I]iodotyrosin-Methylester, Iyophilisiert, ~59 kBq, ~1,6 μ Ci

Der Tracer wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 11 ml cAMP-RIA-Puffer rekonstituiert, gemischt und bei 4°C aufbewahrt.

Antiserum (anti-cAMP-Antikörper) Kaninchen-Anti-Succinyl-cAMP-Serum, lyophilisiert BSA 0,05% (w/v) Das lyophilisierte Antiserum wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 11 ml cAMP-RIA-Puffer rekonstituiert und bei 4°C aufbewahrt.

cAMP-Standard ("Non-acetylation protocol")cAMP-Standard, lyophilisiertAcetat0,05 MThimerosal0,01% (v/v)

Der cAMP-Standard wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 2 ml cAMP-RIA-Puffer rekonstituiert und gemischt. Aus dieser Stammlösung (32 pmol/ml) wurde durch Verdünnung mit cAMP-RIA-Puffer die Standardreihe (0,5-16 nM) hergestellt. Die Standard-Stammlösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

Amerlex-M Reagenz (2. Antikörper)

Das Reagenz wurde vom Hersteller mitgeliefert und bei 4°C aufbewahrt.

3.6.3 Durchführung des cAMP-Radioimmunoassays

Es wurden 50 µl Zellysat aus den verschieden Zellversuchen in den [¹²⁵I]cAMP-RIA eingesetzt. Für die Eichreihe wurden 50 µl nicht-acetylierter cAMP-Standard (32 nM) mit 50 µl cAMP-RIA-Puffer verdünnt und mit jeweils 50 µl cAMP-RIA-Puffer achtmal 1:2 weiterverdünnt. Für die Standardreihe wurden zwei Leerwerte (nur 50 µl cAMP-RIA-Puffer)

und vier Standardpunkte (16 nM, 4 nM, 1 nM und 0,25 nM nicht-acetylierter cAMP-Standard) eingesetzt. Zu den 50 µl Probe und Standard wurden dann 50 µl [125 I]-markierter Tracer und 50 µl Antiserum (anti-cAMP-Antikörper) pipettiert und die Ansätze 3 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Amerlex-M Reagenz (immobilisierter 2. Antikörper) hinzugefügt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper-Antikörper-Komplex wurde 15 min bei Raumtemperatur und 2500 x *g* (4000 rpm, Sigmazentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Sediment im γ -Zähler mit 1 min/Probe gemessen.

3.6.4 Auswertung des cAMP-Radioimmunoassays

Der Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Standards wird als Funktion der Quotienten der Zählimpulse des Standards durch die des Leerwerts (B/Bo) dargestellt, eine Eichgerade durch die Meßpunkte gelegt und die Geradengleichung der Eichgeraden berechnet. Mit Hilfe dieser Geradengleichung wird aus dem Quotienten der Proben-Zählimpulse durch die des Leerwertes (B/Bo) der Logarithmus der cAMP-Konzentration der eingesetzten Proben und daraus die cAMP-Konzentrationen in den Proben berechnet.

	Leerwert	Standardpunkte	Proben
		0,25-16 nM	
Standard	-	50 µl	-
Proben	-	-	10 µl
cAMP-RIA-Puffer	50 µl	-	40 µl
[¹²⁵ I]cAMP	50 µl	50 µl	50 µl
Antiserum	50 µl	50 µl	50 µl
	mischen		
	3 h bei 4°C inkubieren		
Amerlex- Reagenz	250 µl 250 µl 250 µl		250 µl
	mischen		
	15 min bei Raumtemperatur inkubieren		
	15 min bei 2500 x g und Raumtemperatur zentrifugieren		
	Überstand abnehmen und das Sediment auszählen		

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der Durchführung des cAMP-Radioimmunoassays.

3.7 Radioimmunologische Bestimmung von PGE₂ in Zellkulturüberständen von Kupfferzellen der Maus

Die Quantifizierung der PGE₂-Konzentrationen in Zellkulturüberständen wurde mit dem [¹²⁵I]PGE₂ Radioimmunoassay-Kit der Firma Amersham-Pharmacia nach Anweisung des Herstellers in Schnappdeckel-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die eingesetzten Volumina entsprechen der Hälfte der von der Firma angegebenen.

3.7.1 Prinzip

Der RIA basiert auf der Umwandlung von PGE_2 in sein Methyloximat-Derivat durch Methyloxaminhydrochlorid. Durch die Methyloximierung wird einerseits das Methyloximatderivat von PGE_2 stabiler als PGE_2 selbst, andererseits wird die Spezifität und Sensitivität des Tests verbessert, da die Kreuzreaktion mit anderen Prostaglandinen reduziert wird. Anschließend nutzt der RIA die Kompetition zwischen unmarkiertem Methyloximat-PGE₂ der Probe und einer definierten Menge an zugesetztem [125 I]Methyloximat-PGE₂ um einen spezifischen Antikörper gegen Methyloximat-PGE₂ (siehe 3.6.1).

3.7.2 Puffer und Lösungen

PGE ₂ -RIA-Puffer	
Tris/HCI	0,05 M
NaCl	0,9% (w/v)
Triton X-100	0,01% (v/v)
Bactogelatine	0,1% (v/v)

pH 7,4

10 ml einer konzentrierten Pufferlösung wurden vom Hersteller mitgeliefert, 5-10 min gerührt und mit entmineralisiertem H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

Methyloximierungs-Reagenz

Das Reagenz wurde vom Hersteller mitgeliefert und enthält Methyloxaminhydrochlorid und Natriumacetat in nicht angegebenen Konzentrationen in Wasser:Ethanol (9:1 v/v) bei einem pH von 5,6.

[125]]PGE2 (Tracer)

 $[^{125}I]PGE_2$ -Prolin-Tyrosin-Konjugat (Methyloximat-Derivat), enthält 5% (w/v) Lactose, lyophilisiert, ~55,5 kBq, ~1,5 µCi

Der Tracer wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 11 ml PGE₂-RIA-Puffer rekonstituiert, gemischt und bei 4°C aufbewahrt.

Antiserum (anti-Methyloximat-PGE2-Antikörper)

Antiserum, enthält 5% (w/v) Lactose, lyophilisiert

Das lyophilisierte Antiserum wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 11 ml PGE₂-RIA-Puffer rekonstituiert und bei 4°C aufbewahrt.

PGE₂-Standard

PGE₂-Standard, lyophilisiert

Der PGE₂-Standard enthält PGE₂ in seiner Methyloximat-Form. Der Standard wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 2,5 ml PGE₂-RIA-Puffer rekonstituiert und gemischt. Aus dieser Stammlösung (3200 pg/ml) wurde durch Verdünnung mit PGE₂-RIA-Puffer die Standardreihe (160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg, 10 pg, 5 pg, 2,5 pg und 1,25 pg) hergestellt. Die Standard-Stammlösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

Amerlex-M Reagenz (2. Antikörper)

Bei dem 2. Antikörper handelt es sich um an magnetisierbare Polymer-Partikel gebundene Antikörper gegen das F_{ab}-Fragment des 1. Antikörpers.

Das Reagenz wurde vom Hersteller mitgeliefert und bei 4°C aufbewahrt.

3.7.3 Durchführung des PGE₂-Radioimmunoassays

Die bei –70°C gelagerten Zellkulturüberstände von Kupfferzellen der Maus wurden unverdünnt direkt in den RIA eingesetzt. 50 µl der Proben wurden zunächst in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße pipettiert, mit 1 µl Gelatinelösung (5% (w/v) in PBS) und 50 µl Methyloximierungs-Reagenz versetzt und 1 h im Wasserbad bei 60°C inkubiert. 50 µl des Ansatzes wurden nach dem Abkühlen in den RIA eingesetzt. Für die Eichreihe wurden 250 µl PGE₂-Standard (3200 pg/ml) mit 250 µl PGE₂-RIA-Puffer verdünnt und mit jeweils 250 µl PGE₂-RIA-Puffer siebenmal 1:2 weiterverdünnt. Für die Standardreihe wurden zwei Leerwerte (nur 50 µl PGE₂-RIA-Puffer) und acht Standardpunkte (160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg, 10 pg, 5 pg, 2,5 pg und 1,25 pg) eingesetzt. Zu den 50 µl Probe und 50 µl Standard wurden dann 50 µl [125 I]-markierter Tracer und 50 µl Antiserum (anti-PGE₂-Antikörper) pipettiert und die Ansätze über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden 125 µl Amerlex-M Reagenz (immobilisierter 2. Antikörper) hinzugefügt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper-Antikörper-Komplex wurde 10 min bei 4°C und

2500 x *g* (4000 rpm, Sigmazentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Sediment im γ -Zähler mit einer Minute/Probe gemessen.

	Leerwert	Standardpunkte	Proben
		160-1,25 pg	
Standard	-	50 µl	-
Proben	-	-	10 µl
PGE ₂ -RIA-Puffer	50 µl	-	40 µl
[¹²⁵ I]PGE ₂	50 µl	50 µl	50 µl
Antiserum	50 µl	50 µl	50 µl
		mischen	
	Über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren		
Amerlex- Reagenz	125 µl	125 µl	125 µl
	mischen		
	15 min bei Raumtemperatur inkubieren		
	10 min bei 2500 x <i>g</i> und 4°C zentrifugieren		
	Überstand abnehmen und das Sediment auszählen		

Tab. 6: Tabellarische Darstellung der Durchführung des PGE₂-Radioimmunoassays.

3.7.4 Auswertung des PGE₂-Radioimmunoassays

Die Auswertung des RIAs erfolgte wie für den cAMP-RIA unter 3.6.4 beschrieben.

3.8 Bestimmung von TNFα in Zellkulturüberständen durch ELISA (<u>E</u>nzyme-<u>l</u>inked <u>I</u>mmuno<u>s</u>orbent <u>A</u>ssay)

Die Quantifizierung der TNFα-Konzentrationen in Überständen von Maus-Kupfferzellkulturen wurde mit dem Maus-TNFα-OptEIA[™]-Kit der Firma Pharmingen nach Anweisung des Herstellers in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt.

3.8.1 Prinzip

Über einen in ELISA-Platten immobilisierten 1. Antikörper wird TNF α aus Zellkulturüberständen extrahiert. Das Antikörper-gebundene TNF α wird über einen

Peroxidase-gekoppelten 2. Antikörper nachgewiesen. Dabei korelliert die Peroxidase-Aktivität in gewissen Grenzen linear mit der Menge TNF α im Zellkulturüberstand.

3.8.2 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem H₂O angesetzt und bei 4°C gelagert.

<u>Beschichtungspuffer</u>		
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,08 M	14,77 g/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,013 M	18,50 g/l
Der pH-Wert des Puffers wurde auf	6,5 eingestellt und die Lösung bei 4°0	C für maximal einen
Monat gelagert.		

Blockieru	ungspuffer		
FCS		10% (v/v)	1 ml
ad 10 ml	PBS.		
Eür don	Blockiorupgspuffor wurde	hitzoinaktiviertes ECS verwondet	Dazu wurde ECS fü

Für den Blockierungspuffer wurde hitzeinaktiviertes FCS verwendet. Dazu wurde FCS für 30 min bei 56°C inkubiert.

Anti-Maus TNFα-Antikörper (1. Antikörper)

Die Antikörper-Lösung wurde vom Hersteller (Pharmingen) mitgeliefert und bei 4°C gelagert. Zum Vorbeschichten der 96-Well-Vertiefungen wurde die Antikörperlösung 1:250 in Beschichtungspuffer verdünnt.

Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus TNFα-Antikörper (2. Antikörper)

Die Antikörper-Lösung wurde vom Hersteller (Pharmingen) mitgeliefert und bei 4°C gelagert. Vor Einsatz in den ELISA wurde die Antikörper-Lösung 1:250 in Blockierungspuffer verdünnt.

TNFα-Standard

Rekombinantes Maus-TNF α , lyophilisiert

Der TNF α -Standard wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 1 ml H₂O rekonstituiert und bei 4°C gelagert.

<u>PBS</u>

Die Zusammensetzung von PBS ist unter 3.5.1 beschrieben.

<u>Waschpuffer</u>		
Tween-20	0,05% (v/v)	500 µl
ad 1000 ml PBS.		
<u>Natriumcitratlösung</u> Natriumcitrat x 2 H ₂ O	0.1 M	29,41 g/l
2	,	
TMB-Stammlösung		
TMB wurde in einer Konzentration vo	n 42 mM in DMSO gelös	st und in Aliquots bei –20°C
gelagert.		
Substrat-Lösung		
ТМВ	0,42 mM	100 µl 42 mM Stlsg
H ₂ O ₂	1,3 mM	3 µl 30% (v/v) H ₂ O ₂
ad 10 ml 0,1 M Natriumcitratlösung.		
Stop-Lösung		
H ₂ SO ₄	2 N 8	33 µl 100% H ₂ SO ₄ /10 ml

3.8.3 Durchführung des TNFα-ELISAs

Herstellung der TNFα-Standard-Stammlösung und der Standardreihe

Der lyophilisierte TNF α -Standard wurde mit 1 ml H₂O rekonstituiert und 15 min vor Herstellung der Verdünnungsreihe äquilibriert. Die TNF α -Standard-Stammlösung wurde in 50 µl-Aliquots bei –70°C aufbewahrt.

Für die Standardreihe wurde die TNF α -Standard-Stammlösung mit RPMI-Medium auf eine Konzentration von 1000 pg/ml verdünnt und mit jeweils 300 µl RPMI-Medium sechsmal 1:2 weiterverdünnt (500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml und 15,6 pg/ml). Für die Standardreihe wurden ein Leerwert (nur 100 µl RPMI-Medium) und sieben Standardpunkte (1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 32,3 pg/ml und 15,6 pg/ml) in Doppelbestimmungen in den ELISA eingesetzt.

Durchführung des ELISAs

Die Vertiefungen einer 96-Wellplatte wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit 100 μ I/Vertiefung einer frisch angesetzten Verdünnung der Anti-Maus TNF α -Antikörper-Lösung (1. Antikörper, 1:250 in Beschichtungspuffer) vorbeschichtet.

Nach dreimaligem Waschen der Vertiefungen mit 300 µl Waschpuffer/Vertiefung wurden diese mit 200 µl Blockierungspuffer/Vertiefung für 1 h bei Raumtemperatur zur Absättigung

unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden je 100 µl der sieben Standardpunkte und Leerwerte in Doppelbestimmungen sowie 100 µl der Zellkulturüberstände in die Vertiefungen pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen fünfmal gewaschen, bevor 100 µl/Vertiefung einer frisch angesetzten Verdünnung (1:250 in Blockierungspuffer) des Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus TNF α -Antikörper (2. Antikörper) in die Vertiefungen pipettiert wurde und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach sieben Waschschritten wurden 100 µl der Substratlösung zu den Vertiefungen gegeben und die Platte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stoplösung/Vertiefung abgestoppt. Die Extinktion wurde innerhalb von 30 min nach Abstoppen der Reaktion bei 450 nm gemessen.

3.9 Proteinbestimmung nach Bradford et al. (1976)

3.9.1	Puffer	und	Lösungen
-------	--------	-----	----------

BSA-Standard		
BSA	1 mg/ml	10 mg
ad 10 ml H ₂ O.		
Der BSA-Standard wurde in Aliquots bei	–20°C gelagert.	

Bradford-Reagenz		
Serva Blue G No. 35050	0,01% (w/v)	100 mg/l
Ethanol	4,75% (v/v)	50 ml 95% (v/v) Ethanol/l
Phosphorsäure	8,5% (w/v)	100 ml 85% (w/v)
		Phosphorsäure/I

3.9.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurden Zellkulturüberstände oder Kernextrakte von Hepatocyten 1:10 verdünnt. 10 μ I der verdünnten Überstände wurden mit H₂O auf 100 μ I aufgefüllt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Für den Leerwert wurden 100 μ I H₂O mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Innerhalb von 10 min entwickelte sich eine intensive Blaufärbung, die mindestens 1 h stabil war und photometrisch bei 578 nm quantifiziert wurde. Als Standardreihe dienten 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 6 μ g, 8 μ g und 10 μ g BSA; der lineare Bereich lag zwischen 2 μ g und 8 μ g Protein.

3.10 Immunologischer Nachweis des α_2 -Makroglobulin-Proteins sowie des phosphorylierten STAT3- und Jak1-Proteins aus Hepatocyten durch Westernblot-Analyse

3.10.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem H_2O angesetzt und bei 4°C gelagert.

Acrylamid-Lösung

Bei der Acrylamid-Lösung handelte es sich um eine gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wäßrige 30% (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% (w/v) Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (rotiphorese Gel 30 der Firma Roth).

<u>APS-Lösung</u>		
Ammoniumpersulfat	10% (w/v)	1 g/10 ml
Sammelgelpuffer		
Tris/HCI	0,5 M	6,06 g/100ml
SDS	0,4% (w/v)	0,4 g/100 ml
Der Puffer wurde mit HCI auf pH 6,	8 eingestellt und bei 4°C	gelagert.
Trenngelpuffer		
Tris/HCI	1,5 M	18,17 g/100 ml
SDS	0,4% (w/v)	0,4 g/100 ml
Der Puffer wurde mit 12 N HCl auf	pH 8,8 eingestellt und bei	4°C gelagert.
5 x SDS-Probenpuffer		
Tris	400 mM	4,95 g/100 ml
SDS	10% (w/v)	10 g/100 ml
Glycerol	25% (v/v)	25 ml 100% Glycerol/100 ml
Bromphenolblau	0,0125% (w/v)	0,125 g/100 ml
Elektrophorese-Laufpuffer		
Tris	25 mM	3,09 g/l
Glycin	192 mM	14,41 g/l
SDS	0,1% (w/v)	1 g/l
Der Puffer wurde bei Raumtempera	atur gelagert.	

<u>Blottransferpuffer A</u>		
Tris	300 mM	37,08 g/l
SDS	0,1% (w/v)	1 g/l
Methanol	20% (v/v)	200 ml/l
Der Puffer wurde bei Raumtemperatur	r gelagert.	
Blottransfernuffer B		
Tris	25 mM	3 09 a/l
SDS	0.1% (w/v)	0,00 g/l
Methanol	20% (v/v)	200 ml/l
Der Puffer wurde bei Raumtemperatu	r gelagert.	200 111/1
Blottransferpuffer C		
Tris/Borat	25 mM	3,09 g/l
SDS	0,1% (w/v)	1 g/l
Methanol	20% (v/v)	200 ml/l
Der Puffer wurde mit 1 M Borsäure au	f pH 9,0 eingestellt und	bei Raumtemperatur gelagert.
Ponceau S-Färbelösung		
Ponceau S	0,25% (w/v)	2,5 g/l
Methanol	40% (v/v)	400 ml/l
Essigsäure	15% (v/v)	150 ml 100% Essigsäure/l
Die Lösung wurde durch einen Falte	enfilter gegeben und w	ar mindestens 12 Monate bei
Raumtemperatur haltbar.		
PBS		
Die Zusammensetzung von PBS ist ur	nter 3.5.1 beschrieben.	
PBS-Tween-Waschpuffer		<i>.</i> .
Tween-20	0,1% (v/v)	1 ml
ad 1000 ml PBS.		
Blockierungspuffer A		
Magermilchpulver	5% (w/v)	5 g
ad 100 ml PBS-Tween-Waschpuffer.		

<u>TBS</u>		
Tris	19,6 mM	2,42 g/l
NaCl	137 mM	8,0 g/l
Der pH-Wert des Puffers wurde mit	HCI auf 7,6 eingestellt und die Lösur	ng bei 4°C gelagert.
TBS-Tween-Waschpuffer		
Tween-20	0,1% (v/v)	1 ml
ad 1000 ml TBS.		
Blockierungspuffer B		
Magermilchpulver	5% (w/v)	5 g
ad 100 ml TBS-Tween-Waschpuffer	r.	

3.10.2 Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Je 150 µg Protein der Zellkulturüberstände (α_2 -Makroglobulin-Nachweis) bzw. 100 µg Protein der Kernfraktion (STAT3-Nachweis) und 100 µg Protein des Zellysats (Jak1-Nachweis) wurden mit H₂O auf 45 µl aufgefüllt, mit 15 µl 4 x SDS-Probenpuffer mit 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden diese 10 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände auf ein 7,5% (w/v) Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.10.3 Vorbereitung der Gele für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur analytischen Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) eingesetzt. Die verwendeten Gele hatten eine Stärke von 1,5 mm und eine Abmessung von 8,5 cm x 5,5 cm. Die Gele wurden mit dem Elektrophorese-System mini Protean II (BioRad) gegossen und betrieben. Die Glasplatten wurden mit Aceton gereinigt und mit zwei Abstandhaltern zwischen den Platten zusammengesetzt, abgedichtet und die Gele wie folgt gegossen:

Trenngel-Pipettierschema:

	<u>7,5% (w/v)</u>
Acrylamid-Lösung	2,25 ml
H ₂ O	4,5 ml
Trenngelpuffer	2,25 ml
TEMED	15 µl
10% (w/v) APS-Lösung	75 µl

Die einzelnen Komponenten wurden gemischt und bis zu einer Gelhöhe von 5,5 cm zwischen die Glasplatten gefüllt. Zur Glättung der Oberfläche wurde das Gel mit H₂O-gesättigtem n-Butanol überschichtet. Nachdem die Polymerisation beendet war (ca. 30 min), wurde das n-Butanol abgegossen, die Geloberfläche mit H₂O gespült und mit einem Filterpapier getrocknet.

Anschließend wurde das Sammelgel nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Sammelgel-Pipettierschema:

	<u>4,5% (w/v)</u>
Acrylamid-Lösung	0,5 ml
H ₂ O	2,0 ml
Trenngelpuffer	0,833 ml
TEMED	5 µl
10% (w/v) APS-Lösung	25 µl

Die Lösungen wurden zusammenpipettiert, gemischt und bis zur oberen Kante zwischen die Glasplatten gefüllt. Danach wurde der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Polymerisationszeit betrug ca. 20 min. Nach Entfernen des Probenkammes wurden die Geltaschen mit Elektrophorese-Laufpuffer gespült sowie Luftblasen vom unteren Rand der Gele entfernt.





3.10.4 Trennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die vorbereiteten Proben wurden mit einer Hamiltonspritze auf das Gel aufgetragen. Als Standard dienten 10 μ l des HMW-Standards, die parallel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA/Gel im Sammelgel, bis die Proben konzentriert waren und

anschließend bei 20 mA/Gel im Trenngel. Sie wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte.

3.10.5 Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membranen durch Elektroblotting (Westernblot)

Zur Analyse der aufgetrennten Proteine wurden diese im Halbtrocken-Verfahren mit dem Puffersystem von Hirano (1989) auf PVDF-Membranen transferiert. Dazu wurde nach der Gel-Elektrophorese das Sammelgel abgetrennt, die rechte obere Ecke des Trenngels zur Markierung entfernt und das Gel im Blottransferpuffer C für 20 min äquilibriert. Mit einem Skalpell wurden eine PVDF-Membran und vier Whatman-Filter Typ 3MM auf das entsprechende Gelmaß zurechtgeschnitten. Die rechte obere Ecke der Membran wurde ebenfalls markiert. Die Membran wurde kurz in reinem Methanol geschwenkt, wodurch sie gleichmäßig angefeuchtet wurde, und anschließend 2 min in bidestilliertem H₂O gespült. Die Äquilibrierung der Membran erfolgte in Blottransferpuffer B für 10 min.

Der Blotaufbau (Abb. 9) wurde auf der Anodenplatte der Blotvorrichtung durchgeführt, wobei zuerst ein Filterstück in Blottransferpuffer A getränkt und luftblasenfrei auf die Graphitplatte aufgelegt wurde. Dann wurde ein Filter in Blottransferpuffer B getränkt und genau auf den ersten Filter gelegt. Auf die beiden Filter wurde die PVDF-Membran vorsichtig aufgelegt und auf diese das Polyacrylamidgel, so daß die abgeschnittenen Ecken aufeinander paßten. Bei allen Schritten wurden Luftblasen vermieden. Schließlich wurden zwei in Blottransferpuffer C getränkte Filter auf das Gel geschichtet und der Blot mit einem Glasröhrchen vorsichtig komprimiert, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen und um überschüssige Flüssigkeit auszupressen, die dann mit einem Papiertuch entfernt wurde. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und der Transfer erfolgte bei einer gleichmäßigen Stromstärke von 1,2 mA/cm² Gelfläche während 45 min. Nach Abschalten der Spannungsquelle wurde der Blot vorsichtig auseinandergebaut und die PVDF-Membran mit einer Pinzette entnommen.

3.10.6 Reversible Ponceau S-Färbung

Die PVDF-Membran wurde mit Ponceau S-Färbelösung etwa 10 min angefärbt. Anschließend wurde sie in bidestilliertem H₂O gespült, bis die Hintergrundfärbung verschwunden war und die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Die Banden des Molekulargewichtstandards und die Proteinspuren wurden mit Nadelstichen markiert. Entfärbt wurde der Blot mit PBS-Tween-Waschpuffer (α_2 -Makroglobulin) bzw. TBS-Tween-Waschpuffer (STAT3 und Jak1), bis keine Banden mehr zu erkennen waren. 3.10.7 Immunologischer Nachweis der Proteine in der Westernblot-Analyse durch eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer A (a2-Makroglobulin) bzw. Blockierungspuffer B (STAT3 und Jak1) inkubiert. Danach wurde die Membran 10 min in PBS-Tween-Waschpuffer (α_2 -Makroglobulin) bzw. TBS-Tween-Waschpuffer (STAT3 und Jak1) gewaschen und dann über Nacht bei 4°C unter Schwenken mit dem 1. Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-Tween-Waschpuffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver (α_2 -Makroglobulin) bzw. in PBS-Tween-Waschpuffer mit 5% (w/v) BSA (STAT3 und Jak1) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran einmal kurz und dreimal 10 min mit PBS-Tween-Waschpuffer bzw. TBS-Tween-Waschpuffer gewaschen. Dann wurde sie mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (IgG gegen Kaninchen-IgG) in einer Verdünnung von 1:20 000 in PBS-Tween-Waschpuffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver (α_2 -Makroglobulin) bzw. TBS-Tween-Waschpuffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver (STAT3 und Jak1) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Membran anschließend wie zuvor gewaschen. Der Nachweis wurde durch eine Chemilumineszenz-Reaktion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate) der Firma Pierce nach Anweisung des Herstellers abgeschlossen. Dazu wurden Lösung 1 und 2 zu gleichen Teilen zu einem Endvolumen von 0,125 ml/cm² gemischt und auf die Membran aufgetropft. Nach 5 min wurde die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingepackt und überschüssige Lösung entfernt. Lösung 1 enthält das Peroxidase-Substrat Luminol, das in Gegenwart von H₂O₂ (Lösung 2) durch die Peroxidase oxidiert wird. Durch die Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand, durch Emission von Licht wird nach gewisser Zeit der Grundzustand wieder erreicht. Die entstandene Chemilumineszenz wurde direkt mit Hilfe des Chemi Doc™-Systems der Firma BioRad detektiert. Die spezifischen Banden wurden mit dem Software-Programm Quantity One der Firma BioRad quantifiziert.

> Molekularbiologische Methoden <

3.11 Isolierung von Gesamt-RNA

3.11.1 Prinzip

Die RNA-Isolierung mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen beruht auf affinitätschromatographischer Reinigung der RNA an Silicagel-Membranen aus einem Zellysat, das durch zugesetzte DNase von DNA gereinigt ist.

3.11.2 Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O

DEPC 0,1% (v/v) 1 ml/l Bidestilliertes Wasser wurde mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt und 12-14 h bei 37°C inkubiert, um RNasen vollständig zu inaktivieren. Das verbliebene DEPC wurde durch Autoklavieren zersetzt. Alle Lösungen und Puffer für die Isolierung von RNA wurden mit DEPC-H₂O angesetzt. Dadurch sollte der Abbau von RNA durch exogene RNasen verhindert werden.

Lysis-Puffer RLT, Waschpuffer RW1 und Waschpuffer RPE

Die Puffer wurden vom Hersteller (Qiagen) mitgeliefert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der Waschpuffer RPE wurde als Konzentrat geliefert und mußte mit 4 Volumen Ethanol versetzt werden. Die Zusammensetzung wurde von der Firma nicht bekanntgegeben.

3.11.3 Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Total RNA-Kits der Firma Qiagen

Laut Hersteller-Angaben können maximal 3 x 10^7 Zellen in das Kit eingesetzt werden. Zunächst wurden die auf 60 mm-Zellkulturschalen kultivierten Hepatocyten der Ratte, die auf 35 mm-Zellkulturschalen kultivierten Kupfferzellen, sinusoidalen Endothelzellen und Perisinusoidalzellen der Ratte bzw. die auf 24-Wellplatten kultivierten Kupfferzellen der Maus in 300 µl bzw. 50 µl Lysis-Puffer RLT abgekratzt, dem frisch 10 µl 2-Mercaptoethanol/ml zugesetzt wurde. Die Lysate von je drei Zellkulturplatten wurden vereinigt, zur Homogenisierung direkt auf eine QIAshredder-Säule gegeben und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Zu dem Homogenat wurde 1 Volumen 70% (v/v) Ethanol gegeben und gemischt. Die Lösung wurde dann auf eine RNeasy-Spin-Säule pipettiert, 15 s bei 8000 x g (10 000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 700 µl Waschpuffer RW1 gewaschen, 15 s zentrifugiert und der Durchfluß erneut verworfen. Im nächsten Waschschritt wurde die Säule mit 500 µl Waschpuffer RPE gewaschen, 15 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im letzten Waschschritt wurden wiederum 500 µl Waschpuffer RPE auf die Säule pipettiert, diese aber nun 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Flüssigkeit vollständig zu entfernen, da das Ethanol im folgenden Elutionsschritt stört. Zur Elution der RNA wurden 50 µl DEPC-H₂O auf die Säule gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Ein Aliquot der RNA wurde 1:200 mit DEPC-H₂O verdünnt. Die Extinktion der verdünnten RNA-Lösung wurde bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Proteine) gemessen, um so Konzentration und Reinheit der RNA-Lösung zu bestimmen. Es wurde nur RNA verwendet, deren Quotient 260 nm/280 nm > 1,7 ist. Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

RNA-Konzentration = $\Delta E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung x 40 }\mu\text{g/ml}$. Die RNA wurde bei –70°C gelagert.

3.12 Semiquantitative RT-PCR

3.12.1 Prinzip

Prostanoidrezeptoren finden sich nur in geringer Anzahl in der Plasmamembran der verschiedenen Zelltypen der Leber. So finden sich nur ca. 10 000 hochaffine Bindungsstellen des FP-Rezeptors auf Hepatocyten (Neuschäfer-Rube *et al.* 1993) Die entsprechenden mRNAs sind ebenfalls von geringer Häufigkeit und deshalb schwer durch Northern-Blot-Techniken nachzuweisen oder zu quantifizieren. Zum Nachweis der mRNAs der Prostanoidrezeptoren wurde aus diesem Grund die Methode der RT-PCR (<u>R</u>everse <u>T</u>ranskription-<u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction) gewählt. RT-PCR ist nicht nur eine sensitive Methode zum qualitativen Nachweis von mRNA, sie kann auch zur mRNA-Quantifizierung genutzt werden, wenn bestimmte Voraussetzungen gegeben sind. Um eine Aussage über die Expressionsstärke der Prostanoidrezeptoren in den verschiedenen Zelltypen machen zu können, müssen gleiche Mengen an cDNA in die PCR eingesetzt werden. Die cDNA-Lösungen wurden 1:40, 1:160 und 1:640 verdünnt. 5 μl dieser drei cDNA-Verdünnungen wurden zur Mengenbestimmung in eine PCR mit Primern für β-Actin-mRNA eingesetzt.

Das β -Actin-Gen ist ein sogenanntes "House-keeping"-Gen und sollte unter verschiedenen Bedingungen gleichstark exprimiert werden. Die PCR-Produktmenge wurde auf einem Agarosegel analysiert und die cDNA-Mengen für die PCR der G_S- und G_i-gekoppelten Prostanoidrezeptoren bzw. für die PCR des α_2 -Makroglobulin auf gleiche Mengen β -ActinmRNA normalisiert. Als Folge der exponentiellen Natur des Amplifizierungsprozesses der PCR können kleine Unterschiede in der Effizienz des Amplifizierungsprozesses zu signifikanten Unterschieden in der Produktmenge führen. Um die Effizienz in einer PCR möglichst konstant zu halten, wurde ein "Master-Mix" angesetzt, der alle die für eine PCR nötigen Substanzen enthielt, und gleichmäßig auf die PCR-Ansätze verteilt.

Die PCR hat bei logarithmischer Auftragung der Produktmenge gegen die Anzahl der Zyklen einen linearen Bereich, in dem sich die Produktmenge mit jedem Zyklus verdoppelt. Ab einer bestimmten Produktmenge kommt es jedoch zu einer Sättigung. Um eine semiquantitative Aussage über die PCR zu ermöglichen, muß die in der PCR erzielte Produktmenge im linearen Bereich liegen. Den Beweis, daß es nicht zu einer Sättigung in der PCR kommt, wird dadurch geliefert, daß man eine Verminderung der Bandenstärke im Agarose-Gel bei den einzelnen Schritten in einer Verdünnungsreihe der cDNA sehen kann.

3.12.2 Puffer und Lösungen

<u>5 x RT-Puffer</u>		
Tris/HCI	250 mM	300 mg/10 ml
MgCl ₂	15 mM	30 mg/10 ml
KCI	375 mM	0,28 g/10 ml
Die Lösung hatte einen pH-Wert von	8,3 war der Reversen	Transkriptase beigefügt und
wurde bei –20°C gelagert.		

DTT0,1 M0,154 g/lDie Lösung war der Reversen Transkriptase beigefügt und wurde bei –20°C gelagert.

<u>10 x PCR-Reaktionspuffer</u>		
Tris/HCI	750 mM	90,83 g/l, pH 8,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM	13,21 g/l
KCI	100 mM	7,46 g/l
Tween-20	0,1% (w/v)	1ml 100% Tween-20/l
Der Puffer war der PRO-HA-P	olymerase beigefügt und wurde be	i –20°C gelagert.

<u>1 x Verdünnungspuffer</u>		
Glycerin	50% (v/v)	500 ml 100% Glycerin/l
KH ₂ PO ₄	100 mM	1,34 g/l
NaCl	100 mM	5,85 g/l
EDTA	0,1 mM	0,037 g/l
DTT	2 mM	0,3 g/l
Tween-20	0,5% (v/v)	5 ml 100% Tween-20/l
Nonidet P-40	0,5% (v/v)	5 ml 100% Nonidet P-40/l

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,0, war der PRO-HA-Polymerase beigefügt und wurde bei –20°C gelagert.

MgCl2-LösungMgCl2 x 6 H2O25 mMDie Lösung war der PRO-HA-Polymerase beigefügt und wurde bei –20°C gelagert.

3.12.3 Synthese von cDNA-mRNA-Hybriden

Für die Synthese von cDNA-mRNA-Hybriden wurde "Superscript™ II RT" Reverse Transkriptase verwendet. Hierbei handelt es sich um eine retrovirale Polymerase, die in Gegenwart eines DNA-Oligonucleotids (Oligo-dT₁₂₋₁₈) als Startermolekül (Primer) und einzelsträngiger RNA als Matrize, DNA synthetisiert. Für die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA aus Hepatocyten, Kupfferzellen, sinusoidalen Endothelzellen und Perisinusoidalzellen sowie Kupfferzellen der Maus wurden je 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zur RNA-Lösung wurde 1 µl Oligo-dT₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) gegeben. Das Gemisch wurde für 10 min bei 70°C zur Denaturierung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA inkubiert und danach in Eiswasser schockgekühlt, um die Wiederausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Zum Ansatz wurden 4 µl 5 x RT-Puffer, 1 µl einer 10 mM dNTP-Lösung, 2 µl 0,1 M DTT gegeben und der Ansatz 2 min bei 42°C präinkubiert. Dann wurde 1 µl (200 U) der Reversen Transkriptase hinzugefügt. Die Hybridisierung des Oligo-dT-Primers mit dem poly-A-Schwanz der mRNA und nachfolgend die reverse Transkription wurden für 1,5 h bei 42°C

3.12.4 PCR-Protokolle

a) β-Actin:	3 min 95°C; 35 x (1 min 95°C, 1 min 61°C, 2 min 72°C); 10 min 72°C Primer: r β -Act-1F und r β -Act-2R, Produktgröße: 769 bp.
b) DP-Rezeptor:	3 min 95°C; 40 x (1 min 95°C, 1 min 60°C, 2 min 72°C); 10 min 72°C Primer: mDP-1F und mDP-2R, Produktgröße: 466 bp.
b) EP2-Rezeptor:	3 min 95°C; 35 x (1 min 95°C, 1 min 58°C, 2 min 72°C); 10 min 72°C Primer: rEP2-1F und rEP2-2R, Produktgröße: 619 bp.
c) EP3-Rezeptor:	3 min 95°C; 35 x (1 min 95°C, 1 min 65°C, 2 min 72°C); 10 min 72°C Primer: rEP3-1F und rEP3-2R, Produktgröße: 829 bp.
d) EP4-Rezeptor:	3 min 95°C; 35 x (1 min 95°C, 1 min 61°C, 2 min 72°C); 10 min 72°C Primer: rEP4-1F und rEP4-2R, Produktgröße: 659 bp.
e) IP-Rezeptor:	3 min 95°C; 35 x (1min 95°C, 1 min 63°C, 1 min 72°C); 10 min 72°C Primer: rIP-1F und rIP-2R, Produktgröße: 655 bp

f) α_2 -Makroglobulin: 3 min 94°C; 35 x (45 s 94°C, 45 s 54°C, 45 s 72°C); 10 min 72°C Primer: $r\alpha_2$ -MG-1F und $r\alpha_2$ -MG-2R, Produktgröße: 616 bp.

Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden 5 µl cDNA-Verdünnung, 5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer, 5 µl 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Endkonzentration: 0,2 mM), 3 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonzentration: 1,5 mM), 1,5 µl 20 µM sense- und antisense-Primer (Endkonzentration: 0,6 µM), 1,5 µl DMSO bzw. 3 µl DMSO (Endkonzentration: 3% (v/v) bzw. 6% (v/v)) für den EP4-Rezeptor und 0,25 U PRO-HA-DNA-Polymerase gemischt und mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR erfolgte im "Thermocycler" für 35 Zyklen (40 Zyklen bei DP-Rezeptor) unter den oben aufgeführten Bedingungen. Vor Beginn des ersten Zyklus wurde der Denaturierungsschritt bei 95°C um 3 min verlängert. Der DNA-Syntheseschritt des letzten Zyklus wurde um 10 min verlängert, um die Synthese unvollständig replizierter DNA-Stränge abzuschließen.

Die cDNA-Stammlösungen wurden zunächst für die PCR mit den Primern für die β -ActinmRNA 1:80, 1:320 und 1:1280 verdünnt. 5 µl dieser drei Verdünnungen wurden als Matrize in die PCR eingesetzt. Das Ergebnis der PCR wurde auf einem Agarosegel analysiert und die cDNAs für die nachfolgenden PCRs mit den Primern für die ProstanoidrezeptorenmRNAs und für die α_2 -Makroglobulin-mRNA auf gleiche Mengen β -Actin-mRNA angepaßt. Die cDNA-Stammlösungen der verschieden Zelltypen mußten, um im linearen Bereich der PCR zu liegen, für die verschiedenen Prostanoidrezeptoren und für α_2 -Makroglobulin unterschiedlich stark verdünnt werden. Von dieser ersten Verdünnung ausgehend wurde wiederum eine 1:4- und eine 1:16-Verdünnung erstellt, um nachzuweisen, daß die Produktmenge im linearen Bereich des Amplifikationsprozesses liegt. Von diesen drei Verdünnungsstufen wurden je 5 µl in die PCR eingesetzt.

3.13 Agarosegel-Elektrophorese

3.13.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem H₂O angesetzt und bei 4 °C gelagert.

<u>10 x TAE-Puffer</u>		
Tris	0,5 M	60,56 g/l
Natriumacetat	0,2 M	16,4 g/l
EDTA	0,02 M	7,44 g/l
Den Deffensende mit 400 % East		lalas da ut

Der Puffer wurde mit 100 % Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt und autoklaviert.

Probenpuffer TAE-Gele		
Bromphenolblau	0,25% (w/v)	2,5 g/l
Glycerin	40% (v/v)	400 ml/l 100% Glycerin
TAE-Puffer	1 x	100 ml/l 10 x TAE-Puffer
Ethidiumbromid-Lösung		
Ethidiumbromid	10 mg/ml	100 mg/10 ml TAE-Puffer
Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.		

Ethidiumbromid-Bad

Für das Ethidiumbromid-Bad wurden 100 ml TAE-Puffer mit 25 µl der Ethidiumbromid-Lösung versetzt.

3.13.2 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

DNA-Fragmente lassen sich durch Gel-Elektrophorese auftrennen. Das Gel besteht aus Agarose und stellt ein komplexes Netzwerk an polymeren Molekülen dar, das die Diffusion der DNA-Moleküle herabsetzt. DNA-Moleküle sind negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld durch das Gel. Dabei bestimmt die Größe der DNA-Moleküle ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Molekülen ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer relativen Molekülmasse M_r . Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die Gel-Elektrophoresen mit Standard-DNA-Fragmenten von bekannter Größe durchgeführt. Die Agarosekonzentration der Gele richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Aufgrund der Größe der PCR-Produkte der Prostanoidrezeptoren bzw. des α_2 -Makroglobulin-Promotorfragmentes wurden 2% (w/v) bzw. 1% (w/v) Agarosegele verwendet.

Die eingewogene Agarose ("Ultra Pure" Qualität) wurde in 1 x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät aufgekocht und entgast. Die Lösung wurde auf ca. 60°C abgekühlt und in eine Flachbettkammer mit senkrecht eingestecktem Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt. Das Gel wurde in eine Laufkammer gelegt und diese so weit mit Laufpuffer (1 x TAE) gefüllt, daß das Gel mit einer Pufferschicht bedeckt war. Die zu analysierende Probe wurde mit 1/5 Volumen Probenpuffer gemischt und die Geltaschen mit 15 µl DNA-Probe beladen. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde eine Geltasche mit dem Längenstandard SmartLadder beladen. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 80 V für 1,5-2 h, bis der Bromphenolblau-Farbstoff die anodische Gelkante erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und für 20-30 min in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Ethidiumbromid ist eine aromatische Verbindung, die mit den Basen der DNA interkaliert und durch UV-Licht zu oranger Fluoreszenz angeregt wird. So

konnten die DNA-Fragment auf einem UV-Leuchtkasten (300 nm) sichtbar gemacht und mit einem Videosystem mit angeschlossenem Thermodrucker dokumentiert werden.

3.14 Klonierung eines α_2 -Makroglobulinpromotor-Konstruktes der Ratte

Bei der Klonierung des Plasmids pGL3- α 2MG1500 wurde ein ca. 1500 bp großes Fragment aus dem 5'-untranslatierten Bereich des α_2 -Makroglobulingens der Ratte in die *Mlu*l- und *Xho*l-Schnittstelle des Vektors pGL3-Basic (Promega, Abb. 5) ligiert, sodaß das Luciferasegen des Vektors unter der Kontrolle des α_2 -Makroglobulin-Promotors stand. Damit konnte der Einfluß von IL-6 und PGE₂ auf die transkriptionelle Aktivität des α_2 -Makroglobulin-Promotors der Ratte untersucht werden.

3.14.1 Isolierung genomischer DNA aus Hepatocyten der Ratte mit Hilfe des DNeasy DNA-Kits der Firma Qiagen

Prinzip

Genomische DNA wurde mit Hilfe des DNeasy-Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aus frisch präparierten Hepatocyten der Ratte (siehe 3.1) isoliert. Der Kit benutzt eine Silacagel-Membran zur Reinigung zellulärer DNA ohne Phenol-, Chloroform- oder Ethanol-Präzipitation. Die Zellen werden zunächst durch Proteinase K lysiert. Die Pufferbedingungen sind so gewählt, daß eine optimale selektive DNA-Bindung an die Membran stattfindet. Durch Zentrifugation werden Kontaminationen und Enzyminhibitoren wie Proteine oder divalente Kationen entfernt. Die gereinigte DNA kann anschließend mit Puffer AE oder H₂O eluiert werden.

Puffer und Lösungen

PBS

Die Zusammensetzung von PBS ist unter 3.5.1 beschrieben.

Proteinase K, Puffer AL, Waschpuffer AW1, Waschpuffer AW2 und Elutionspuffer AE

Die Proteinase K-Lösung und die Puffer wurden vom Hersteller (Qiagen) mitgeliefert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Waschpuffer AW1 und AW2 wurden als Konzentrat geliefert und mußten mit den angegebenen Volumina Ethanol versetzt werden. Die Zusammensetzungen wurden von der Firma nicht bekanntgegeben.

Isolierung genomischer DNA aus Hepatocyten der Ratte

Je 5 x 10^6 Hepatocyten wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x *g* sedimentiert und in 200 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL

wurde das Zellysat sorgfältig gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Nachdem die Lysate abgekühlt waren, wurden 200 μ l 100% Ethanol zugegeben und gemischt. Die Lösung wurde auf eine DNeasy-Spin-Säule pipettiert, 1 min bei 10 000 x *g* (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Die Säule wurde mit 500 μ l Puffer AW1 gewaschen, 1 min zentrifugiert und der Durchfluß wieder verworfen. Nach erneutem Waschen mit Puffer AW2 wurde die Säule 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein Schnappdeckel-Reaktionsgefäß gestellt und 200 μ l Puffer AE auf die Säule pipettiert. Nach einer Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wurde die Säule 1 min bei 10 000 x *g* (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert.

Ein Aliquot des DNA-haltigen Eluats wurde 1:200 mit H₂O verdünnt. Die Extinktion der verdünnten DNA-Lösung wurde bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) gemessen, um so Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung zu bestimmen. Es wurde nur DNA verwendet, deren Quotient 260 nm/280 nm > 1,7 ist. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

DNA-Konzentration = $\Delta E_{260 \text{ nm}}$ x Verdünnung x 50 µg/ml. Die Hepatocyten-DNA wurde bei –70°C gelagert.

3.14.2 PCR mit genomischer DNA aus Hepatocyten der Ratte

Zur Amplifikation eines ca. 1500 bp großes Fragmentes aus dem 5'-untranslatierten Bereichs des α_2 -Makroglobulingens wurden 2 µg genomische DNA aus Hepatocyten der Ratte als Template in eine PCR mit den Primern α 2MG-*Mlu*l-1F und α 2MG-*Xho*l-R eingesetzt.

Puffer und Lösungen

10 x PCR-Reaktionspuffer

Die Zusammensetzung des 10 x PCR-Reaktionspuffers ist unter 3.12.4 beschrieben.

<u>1 x Verdünnungspuffer</u> Die Zusammensetzung des 1 x Verdünnungspuffers ist unter 3.12.4 beschrieben.

MgCl₂-Lösung

Die Zusammensetzung der MgCl₂-Lösung ist unter 3.12.4 beschrieben.

PCR

PCR-Protokoll: 3 min 95°C; 35 x (1 min 95 °C, 1 min 61°C, 2 min 72°C); 10 min 72°C

Für einen 100 µl PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA, 10 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer, 10 µl 2 mM dATP,dCTP, dGTP und dTTP (Endkonzentration: 0,2 mM), 6 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonzentration: 1,5 mM), 3 µl 20 µM der Primer α 2MG-*Mlu*l-1F und α 2MG-*Xho*l-R (Endkonzentration: 0,6 µM), 3 µl DMSO (Endkonzentration: 3% (v/v)) und 1 U PRO-HA-DNA-Polymerase gemischt und mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Die PCR erfolgte im "Thermocycler" für 35 Zyklen unter den oben aufgeführten Bedingungen. Vor Beginn des ersten Zyklus wurde der Denaturierungsschritt bei 95°C um 3 min verlängert. Der DNA-Syntheseschritt des letzten Zyklus wurde um 10 min verlängert, um die Synthese unvollständig replizierter DNA-Stränge abzuschließen.

3.14.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem Jetsorb-Kit der Firma Genomed

Puffer und Lösungen

Jetsorb-Suspension

Die Suspension enthält Silikate in besonderer poröser Modifikation ohne genauere Angaben. Sie wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer A1

Der Puffer A1 (hohe Salzkonzentration) enthält Natriumacetat und Tris-Borat-EDTA-Solubilisierer ohne genauere Angaben. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer A2

Der Puffer A2 (niedrige Salzkonzentration) enthält Ethanol, Natriumchlorid, EDTA und Tris/HCl ohne genauere Angaben. Er wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Banden der in der PCR amplifizierten und in der Elektrophorese (siehe 3.13) aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, die Gelstücke in ein Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt und das Gewicht der Gelstücke bestimmt. Die Agarose wurde in 300 µl Puffer A1/100 mg Gel mit 10 µl Jetsorb-Suspension/100 mg Gel für 15 min bei 50°C unter Schütteln solubilisiert. Während dieser Inkubation band die DNA an die Silicagel-Partikel der Jetsorb-Suspension. Anschließend wurden die Proben 30 s bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 300 µl Puffer A1/100 mg Gel resuspendiert. Die Lösung wurde erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 300 µl Puffer

A2/100 mg Gel resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Sediment nochmals mit Puffer A2 gewaschen, zentrifugiert und dann an der Luft oder kurz in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Elution der an die Partikel gebundenen DNA wurde das Sediment in 20 μ l H₂O suspendiert und für 5 min bei 50°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand, der die eluierte DNA enthielt, in ein Schnappdeckel-Reaktionsgefäß überführt.

3.14.4 Quantitative Bestimmung der DNA-Extraktion

1 μl der gereinigten DNA wurde mit 5 μl Probenpuffer vermischt, auf ein 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Menge vergleichend mit in der Nebenspur aufgetragenen 5 μl SmartLadder-Standards bestimmt. Die DNA-Banden des SmartLadder-Standards entsprachen folgenden DNA-Mengen:

Größen der DNA-Bande	Enthaltende DNA-Menge
10 000 bp	100 ng
8 000 bp	80 ng
6 000 bp	60 ng
5 000 bp	50 ng
4 000 bp	40 ng
3 000 bp	30 ng
2 500 bp	25 ng
2 000 bp	20 ng
1 500 bp	15 ng
1 000 bp	100 ng
800 bp	80 ng
600 bp	60 ng
400 bp	50 ng
200 bp	40 ng

3.14.5 Klonierung des PCR-Produktes in das Plasmid pGEM[®]-T

Für die Klonierung wurde das pGEM[®]-T-Vektor-Kit der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Der Vektor (siehe Abb. 4) war vom Hersteller mit der Restriktionsendonuclease *EcoR*V geschnitten und enthielt je ein 3'-terminales Thymidin an beiden Enden, wodurch eine Rezirkularisierung der Plasmids verhindert und eine verbesserte Kompatibilität zu der von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA erreicht wird. Die verwendete PRO-HA-Polymerase besitzt eine terminale Desoxynucleotidyl-Transferase-Aktivität. Dies führt dazu, daß ein zusätzliches Desoxy-Adenin an das 3'-Ende des fertig synthetisierten DNA-Stranges addiert wird.

Puffer und Lösungen

10 x Reaktionspuffer, T4-Ligase und Vektor waren im pGEM[®]-T-Vektor-Kit enthalten. Die Zusammensetzung des Puffers wurde vom Hersteller nicht angegeben. Der Kit wurde bei -20°C gelagert.

Ligation des PCR-Produktes und des pGEM[®]-T-Vektors

Es wurden 150 ng PCR-Produkt und 100 ng Vektor eingesetzt, womit die α_2 -Makroglobulinpromotor-DNA in einem 3-fachen molaren Überschuß vorlag. Der Ansatz wurde zusammen mit 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl T4-Ligase (3 U) mit H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde sofort für die Transformation von E. coli durch Elektroporation verwendet (siehe 3.16).

3.15 Herstellung kompetenter E. coli XL-1 (blue) Zellen für die Elektroporation

Die Herstellung kompetenter E. coli XL-1 (blue) Zellen und die Elektroporation erfolgte nach Dower et al. (1988).

3.15.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H₂O angesetzt und bei 4°C gelagert.

<u>Elektroporationslösung</u>		
Glycerol	10% (v/v)	100 ml 100% Glycerol/l
Die Lösung wurde mit sterilem H ₂ O angesetzt.		

LB-(Tetra-)Agarplatten		
LB-Agar	3,2% (w/v)	32 g/l
Tetracyclin	0,5% (w/v)	5 g/l
Die Lösung wurde autoklaviert, a	uf 46°C abgekühlt, mit Tetracyclin verse	etzt und 20 ml pro

Petrischale ausplattiert. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

LB-(Tetra-)Medium		
Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)	5 g/l
Tetracyclin	0,5% (w/v)	5 g/l
Trypton	1% (w/v)	10 g/l
NaCl	1% (w/v)	10 g/l
Dee Medium wurde auteklewiert	und hai 1°C galagart	

Das Medium wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

3.15.2 Vorbereitung der E. coli XL-1 (blue) Zellen

5 µl einer Glycerinkultur von *E. coli* XL-1 Zellen wurden auf LB-(Tetra-)Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie in 5 ml LB-(Tetra-)Medium überführt und wiederum über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden diese 5 ml Bakteriensuspension in 250 ml LB-(Tetra-)Medium überführt und bei 37°C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD_{550} nm von 0,5-1,0 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) erreicht hatte. Die Bakterien wurden im Eisbad abgekühlt und 15 min bei 4000 rpm (2500 x *g*, Sigmazentrifuge) und 4°C sedimentiert. Danach wurden die Bakteriensuspension, einmal mit 1/2 Volumen und einmal mit 1/20 Volumen Elektroporationslösung gewaschen. Nach jedem Waschschritt wurden die Bakterien bei 4°C 15 min bei 4000 rpm (2500 x *g*, Sigmazentrifuge) zentrifugiert. Am Ende der Waschschritte wurde das Sediment in 1/500 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension mit Elektroporationslösung resuspendiert (Zellzahl ca. 10^{10} /ml). Es wurden je 50 µl der Zellsuspension in Schnappdeckel-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.16 Transformation kompetenter *E. coli* XL-1 (blue) Zellen durch Elektroporation

3.16.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H₂O angesetzt und bei 4°C gelagert.

SOB-Medium		
Trypton	20% (w/v)	20.0 g/l
Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)	5,0 g/l
NaCl	10 mM	0,6 g/l
KCI	2,7 mM	0,2 g/l
Die Lösung wurde auf pH 7,0 eir	ngestellt, autoklaviert und bei 4°C gelager	t.

SOC-Medium		
SOB-Medium		980 µl/ml
MgCl ₂	20 mM	10 µl 2 M Stlsg/ml
Glucose	20 mM	10 µl 2 M Stlsg/ml
Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebraud	h angesetzt und im Wasserb	ad auf 37°C erwärmt.

<u>LB-Medium</u>		
Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)	5 g/l
Trypton	1% (w/v)	10 g/l
NaCl	1% (w/v)	10 g/l
Mit NaOH wurde ein pH von 7,3 eing	gestellt und das Medium so	fort nach dem Ansetzen
autoklaviert.		
Ampicillin-Stammlösung		
Ampicillin	5 mg/ml	250 mg/50 ml
Die Lösung wurde durch einen 0,4 μm-	Filter sterilfiltriert und in Aliqu	uots bei –20°C gelagert.
		0 0
LB-(Amp-)Medium		
LB-Medium		5 ml
Ampicillin	50 μg/ml	50 µl 5 mg/ml Stlsg
I.P. (Amp.)Platton		
	2.2% (w/w)	22 a/l
LD-Ayai	5,2 /0 (W/V)	10 ml 5 mg/ml Stlcg/l
Die Lösung wurde autoklaviert, auf 46	ου μγ/πι S°C shaekühlt, mit Ampicillir	versetzt und 20 ml pro
Patrischale ausplattiert. Die Platten wu	rden bei 4°C gelagert	
	iden bei 4 C gelagert.	
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolvl-β-D-ga	laktopyranosid)	
X-Gal	2% (w/v)	0,2 g
ad 10 ml DMF.		
Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.		
IPTG-Lösung		
IPTG	100 mM	2,38 g/100 ml
Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm-	Filter sterilfiltriert und in Aliqu	uots bei –20°C gelagert.

3.16.2 Transformation durch Elektroporation

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli* XL-1 Zellen wurden 50 μ l elektrokompetenter Zellen während des Auftauens mit 1-2 μ l Ligationsansatz gemischt. Die Zellen wurden in die zuvor gekühlten Transformationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm pipettiert und mit einem Puls von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 μ F elektroporiert. Um das Absterben der Zellen zu minimieren, wurde sofort nach dem Puls 950 μ l auf 37°C erwärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension 60 min bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Ein Gemisch aus 40 μl X-Gal/DMF und 100 μl IPTG-Lösung wurde auf LB-(Amp-)Platten ausgestrichen. Die Platten wurden 30 min in der Sterilbank offen stehengelassen, damit das DMF abdampfen konnte. Nach der Inkubation der Zellen wurden 50-200 μl des Transformationsansatzes auf den LB-(Amp-)Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da der pGEM[®]-T-Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin enthält, konnten nur transformierte Bakterienklone auf den LB-(Amp-)Platten wachsen. Durch die Vorbehandlung der LB-(Amp-)Platten mit X-Gal/IPTG konnten Bakterienkolonien, die rekombinante Plasmide mit dem integrierten DNA-Fragment enthielten, von Bakterienkolonien, die "leere" religierte Plasmide enthielten, dadurch unterschieden werden, daß Bakterien mit dem rekombinanten Plasmid nach der Induktion des *lacZ*-Gens durch IPTG das Substratanalogon X-Gal durch die β-Galactosidase nicht mehr zu dem tiefblauen 5-Brom-4-chlorindigo umsetzen konnten und weiß blieben. Diese positiven Kolonien wurden mit Hilfe einer Pipette "gepickt", in 5 ml LB-(Amp-)Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

3.17 Analyse rekombinanter Bakterienkolonien durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab

Die Plasmidpräparation wurde mit dem Kit "GFX™ Micro Plasmid Prep" der Firma Amersham-Pharmacia nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

3.17.1 Prinzip

Das Prinzip der Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mittels Affinitäts-Chromatographie über eine Glasfaser-Matrix besteht darin, daß die nach der Präzipitation eines großen Teils der Bakterienproteine und der genomischen DNA und dem Abbau von RNA durch RNasen noch im Zellysat vorhandenen Bestandteile sukzessiv eluiert werden. Die Säulen besitzen eine Glasfaser-Matrix, die kovalent mit einer hydrophilen Substanz beschichtet sind. Durch die hohe Ladungsdichte auf der Oberfläche der Partikel entsteht ein weites Separationsspektrum; durch Veränderung des pH-Wertes und der Ionenstärke der Puffer werden nacheinander Proteine, Metaboliten, Polysaccharide, dNTPs, dann RNA und einzelsträngige DNA und schließlich doppelsträngige Plasmid-DNA eluiert.

3.17.2 Puffer und Lösungen

Resuspendierungspuffer (Lösung 1)		
Tris/HCI	100 mM	1210 mg/100 ml
EDTA	10 mM	372,3 mg/100 ml
RNase A	0,4 mg/ml	40 mg/100 ml
Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7	7.5 und wurde bei 4°C gelagert.	

Lysispuffer (Lösung 2)

NaOH1 M4 g/100 mlSDS5,3% (w/v)5,3g/100 mlDer Puffer wurde als 5,3-fach konzentrierte Lösung geliefert, wurde mit destilliertem H2Overdünnt und bei Raumtemperatur gelagert.

Neutralisationspuffer (Lösung 3)

Der Puffer enthält Acetat und Guanidinhydrochlorid ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Waschpuffer (Lösung 4)

Der Puffer enthält Ethanol, NaCl, EDTA und Tris/HCl ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

3.17.3 Reinigung der Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie im Mini-Maßstab

Es wurden 4,5 ml der Übernachtkultur in einem Schnappdeckel-Reaktionsgefäß bei 14 000 rpm (15 800 x g) und Raumtemperatur in der Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand verworfen, das Sediment in 150 μ l Resuspendierungspuffer suspendiert und zur Lyse der Zellen mit 150 μ l Lysispuffer versetzt. Danach wurden 300 μ l Neutralisationspuffer zugegeben und das Schnappdeckel-Reaktionsgefäß mehrmals invertiert, bis sich eine homogene Phase gebildet hatte. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur und 14 000 rpm (15 800 x g) für 5 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand auf eine GFX-Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 30 s bei 14 000 rpm (15 800 x g) zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, die Säule mit 300 μ l Waschpuffer gewaschen und zweimal je 30 s bei 14 000 rpm (15 800 x g) zentrifugiert, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues Schnappdeckel-Reaktionsgefäß überführt, mit 50 μ l H₂O 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, 1 min bei 14 000 rpm (15 800 x g) zentrifugiert und die Plasmid-DNA so eluiert.

3.17.4 Photometrische Quantifizierung der gereinigten Plasmid-DNA

10 μ I der DNA-Lösung wurden in 500 μ I H₂O verdünnt, das Photometer gegen H₂O geeicht und die OD bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde nach folgender Formel bestimmt:

DNA-Konzentration = $\Delta E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung x 50 } \mu\text{g/ml}$. Die Reinheit wurde durch Quotientenbildung der OD_{260 nm} zur OD_{280 nm} errechnet. Eine ausreichende Reinheit wurde durch einen Quotienten OD_{260 nm}/OD_{280 nm} > 1,8 definiert.

3.17.5 Spezifische Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung

Puffer und Lösungen

<u>10 x Restriktionsenzympuffer</u>

Der Puffer wurde vom Hersteller mitgeliefert und enthielt folgende Komponenten:

Tris/HCI	500 mM	5 ml 1 M Stlsg/10 ml	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mM	0,203 mg/10 ml	
NaCl	1 M	0,584 mg/10 ml	
DTT	10 mM	1 ml 100 mM Stlsg/10 ml	
Der Puffer hatte einen pH von 7,5 und wurde bei –20°C gelagert.			

Spezifische Spaltung der Plasmid-DNA pGEM[®]-T- α 2MG1500

Es wurden 100 ng der isolierten Plasmid-DNA, 0,5 μ l *Mlu*l (5 U), 0,5 U *Xho*l (5 U) und 2 μ l 10 x Restriktionsenzympuffer mit H₂O auf ein Volumen auf 20 μ l aufgefüllt und für ca. 90 min bei 37°C inkubiert. Die Spaltung wurde durch Zugabe von 5 μ l DNA-Probenpuffer beendet und durch Auftragen auf ein 1% (w/v) Agarosegel analysiert (siehe 3.14.3). Plasmide, die nach der Spaltung auf dem Agarosegel DNA-Fragmente der richtigen Größe lieferten, wurden für die Isolierung der entsprechenden Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab verwendet (siehe 3.18).

3.18 Klonierung des Promotorfragmentes in pGL3-Basic

3.18.1 Puffer und Lösungen

10 x Restriktionsenzympuffer

Die Zusammensetzung des 10 x Restriktionsenzympuffers ist unter 3.17.5 beschrieben.

5 x T4-Ligationspuffer (GibcoBRL)

Der Puffer wurde vom Hersteller mitgeliefert und enthielt folgende Komponenten:

Tris/HCI	250 mM	2,5 ml 1 M Stlsg/10 ml
MgCl ₂	50 mM	0,102 mg/10 ml
ATP	5 mM	0,26 g Dinatriumsalz/10 ml
DTT	5 mM	0,5 ml 100 mM Stlsg/10 ml
Polyethylenglykol	25% (w/v)	2,5 g/10 ml
Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,6	6 und wurde bei –20°C g	jelagert.

3.18.2 Spezifische Spaltung von pGEM[®]-T- α 2MG1500 und pGL3-Basic

Es wurden 500 ng der isolierten Plasmid-DNA pGEM[®]-T- α 2MG1500, 0,5 µl *Mlu*l (5 U), 0,5 U *Xho*l (5 U), 2 µl 10 x Restriktionsenzympuffer mit H₂O auf ein Volumen auf 20 µl aufgefüllt und für ca. 90 min bei 37°C inkubiert. Für die Spaltung des Vektors pGL3-Basic wurden 1 µg Plasmid eingesetzt. Die Spaltung wurde durch Zugabe von 5 µl DNA-Probenpuffer beendet. Die beiden Spaltungsansätze wurden vollständig auf ein 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen. Das durch die Spaltung aus pGEM[®]-T geschnittene Promotorfragment α 2MG1500 sowie der gespaltene Vektor pGL3-Basic wurden aus dem Agarosegel isoliert und quantifiziert (siehe 3.14.3 und 3.14.4).

3.18.3 Ligation des Promotorfragmentes und des Vektors pGL3-Basic

Es wurden 100 ng α 2MG1500-DNA und 100 ng Vektor eingesetzt, womit die α_2 -Makroglobulin-DNA in einem 3-fachen molaren Überschuß vorlag. Der Ansatz wurde zusammen mit 2 µl 10 x T4-Ligationspuffer und 1 µl T4-Ligase (3 U) mit H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde sofort für die Transformation von *E. coli* wie unter 3.16.2 beschrieben verwendet. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsenzym-Spaltung wie unter 3.17.5 beschrieben nachgewiesen.

3.19 Isolierung der Plasmid-DNA pGL3-α2MG1500 im Maxi-Maßstab

Die Präparation wurde mit dem Jetstar-Kit der Firma Genomed nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Alle Lösungen waren im Kit enthalten.

3.19.1 Prinzip

Das Prinzip der Isolierung von Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie ist unter 3.17.1 beschrieben.

3.19.2 Puffer und Lösungen

Resuspendierungspuffer (Lösung 1)	
Tris/HCI	50 mM	6,055 g/l
EDTA	10 mM	3,723 g/l
RNase A	0,1 mg/ml	100 mg/l
Der Puffer hatte einen pH-Wert von	8,0 und wurde bei 4°C gelagert.	
Lysispuffer (Lösung 2)		
NaOH	200 mM	8,00 g/l
SDS	1% (w/v)	10,00 g/l
Der Puffer wurde bei Raumtempera	itur gelagert.	
Neutralisationspuffer (Lösung 3)		
Natriumacetat	3,1 M	314,1 g/l
Der Puffer hatte einen pH-Wert von	5,5 und wurde bei Raumtemperatur gelagert.	
Waschpuffer (Lösung 4)		
NaCl	800 mM	46,7 g/l
Natriumacetat	100 mM	8,2 g/l
Der Puffer hatte einen pH-Wert von	5,0 und wurde bei Raumtemperatur gelagert.	
Elutionspuffer (Lösung 5)		
NaCl	1250 mM	73,0 g/l
Tris	100 mM	12,11 g/l
Der Puffer hatte einen pH-Wert von	8,5 und wurde bei Raumtemperatur gelagert.	
<u>Äquilibrierungspuffer (Lösung 6)</u>		
NaCl	600 mM	35,0 g/l
Natriumacetat	100 mM	8,2 g/l
Triton X-100	0,15% (v/v)	1,5 g/l
Der Puffer hatte einen pH-Wert von	5,0 und wurde bei Raumtemperatur gelagert.	

3.19.3 Isolierung der Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie

Es wurden 150 ml LB-(Amp)-Medium mit 1 ml pGL3- α 2MG1500-transformierter *E. coli* XL-1-Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann 20 min bei 10 400 *x g* sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml Resuspendierungspuffer, der 0,1 mg/ml RNase enthielt, resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Lysispuffer für 2-5 min bei Raumtemperatur lysiert. Zur Neutralisierung des Lysats wurden 10 ml Neutralisationspuffer zugegeben, die Suspension durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und bei 27 000 x g (15 000 rpm, Sorvall-Zentrifuge) für 10 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Affinitäts-Chromatographie-Säule gegeben, die zuvor mit 30 ml Äquilibrierungslösung gewaschen worden waren. Nachdem der Überstand die Säule passiert hatte, wurde die Säule mit 60 ml Waschpuffer gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 15 ml Elutionspuffer aus der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA-haltige Lösung wurde mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und die so präzipitierte Plasmid-DNA 1 h bei 27 000 x g (15 000 rpm, Sorvall-Zentrifuge) und 4°C in der Sovall-Zentrifuge sedimentiert. Nach einem Waschschritt mit 1,5 ml 70% (v/v) Ethanol und erneutem Zentrifugieren für 30 min bei 27 000 x g (15 000 rpm, Sorvall-Zentrifuge) und 4°C wurde die Plasmid-DNA an der Luft getrocknet, in 400 μ l H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch wie unter 3.17.4 beschrieben bestimmt.

3.20 Sequenzierung des Promotorkonstruktes pGL3-α2MG1500 mit dem Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenzer

3.20.1 Prinzip

Die Sequenzierung des Promotorkonstruktes wurde mit dem Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenziergerät der Firma Beckman Coulter Bioresearch (Model CEQ-2000) durchgeführt. Es wurde das "CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing" Kit der Firma Beckman Coulter Bioresearch entsprechend der Herstellervorschrift angewendet. Bei dieser Methode werden vier mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte 2',3'-Didesoxyribonucleosidtriphosphate (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP, CEQ Dye Terminatoren), die bei unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszieren, mit nicht-markierten Desoxyribonucleosidtriphosphaten, Sequenzierungspuffer, 100 fmol Plasmid, 3,2 pmol nicht-markiertem Primer und 4 U DNA-Polymerase gemischt und eine "PCR" durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird nur ein Primer eingesetzt, so daß nur ein Strang immer wieder abgeschrieben wird. Die Didesoxyribonucleosidtriphosphate führen statistisch nach unterschiedlich langer Polymerase-Reaktion zum Kettenabbruch, da ihnen das 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Es entstehen am 3'-Ende mit Basenspezifischen Farbstoffen markierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge; diese werden denaturiert, im Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenziergerät elektrophoretisch aufgetrennt und durch ihre Fluoreszenz im Gel nachgewiesen.

3.20.2 Puffer und Lösungen

10 x Sequenzierungspuffer

Die Lösung wurde vom Hersteller mitgeliefert. Die Zusammensetzung wurde von der Firma nicht bekanntgegeben.

<u>dNTP-Mix</u>

Die Lösung enhielt dUTP, dGTP, dCTP und dATP in nicht angegebener Konzentration und wurde vom Hersteller mitgeliefert.

<u>CEQ[™] Dye Terminatoren</u>

ddUTP Dye Terminator ddGTP Dye Terminator ddCTP Dye Terminator ddATP Dye Terminator Die Lösungen wurden vom Hersteller mitgeliefert, die Zusammensetzung wurde nicht bekanntgegeben.

Natriumacetat-Stammlösung

Natriumacetat3 M480 g/lDer pH-Wert der Lösung wurde auf 5,2 eingestellt und die Lösung bei Raumtemperatur
gelagert.

EDTA-Stammlösung

EDTA 100 mM 35 g/l Der pH-Wert der Lösung wurde auf 8,0 eingestellt und die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

StoplösungNatriumacetat1,5 M2 µl der 3 mM Natriumacetat-StlsgEDTA50 mM2 µl der 100 mM EDTA-StlsgDie Stoplösung wurde jeweils kurz vor Gebrauch frisch angesetzt.

<u>Glykogen-Lösung</u>		
Glykogen	2% (w/v)	20 g/l
<u>Trenngel</u>

Eine Trenngelkartusche CEQ[™]-Trenngel I wurde vom Hersteller mitgeliefert und enthält 10 ml gepufferte Polyacrylamid-Siebmatrix mit Harnstoff ohne genauere Angaben der Zusammensetzung.

Trennpuffer

Der Trennpuffer CEQ[™] wurde vom Hersteller mitgeliefert und enthält als wirksame Bestandteile < 10% organische Puffersalze ohne genauere Angaben der Zusammensetzung.

3.20.3 Sequenzierungsreaktionen

Prämix für eine Reaktion	
10 x Sequenzierungspuffer	2 µl
dNTP-Mix	1 µl
ddUTP Dye Terminator	2 µl (900 µM)
ddGTP Dye Terminator	2 µl (450 µM)
ddCTP Dye Terminator	2 µl (15 µM)
ddATP Dye Terminator	2 µl (4 µM)
DNA-Polymerase	1 µl (4 U)

Die Sequenzierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Prämix	12 µl
DNA-Matrize	100 fmol Plasmid
Primer	3,2 pmol
H ₂ O	ad 20 µl

Dieses Gemisch wurde für 30 Zyklen in einem Biometra Thermocycler Modell 9600 mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung: 20 s bei 96°C; Anlagerung der Primer: 20 s bei 50°C; Kettenverlängerung: 4 min bei 60°C.

3.20.4 Aufarbeitung der Sequenzierproben

Nach Abschluß der Sequenzierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt und wie folgt aufgearbeitet: dem Reaktionsansatz wurden 2,5 μ l Stoplösung, 0,5 μ l Glykogen-Lösung und 60 μ l 95% (v/v) Ethanol (–20°C) hinzugefügt. Dann wurde die Probe 10 min bei –20°C inkubiert, 15 min bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 200 μ l 70% (v/v) Ethanol (–20°C) resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, das Sediment 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 40 µl deionisiertem Formamid der Firma J.T. Baker aufgenommen.

Die DNA-Proben wurden danach in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, mit Parafinöl überschichtet und in den Kapillarelektrophorese-Sequenzierer gestellt, wo sie denaturiert und dann auf das Trenngel innerhalb der Kapillaren aufgetragen wurden. Die Polynucleotide wurden elektrophoretisch der Größe nach im Gel aufgetrennt. Die vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffgruppen, die jeweils an ein bestimmtes Nucleotid gekoppelt waren, wurden durch einen Infrarot-Diodenlaser angeregt, und die vier Fluoreszenzwellenlängen wurden durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzierers anhand ihrer unterschiedlichen Emissions-wellenlänge identifiziert und quantifiziert.

3.21 Transfektion von Hepatocyten der Ratte mit der Calcium-Phosphat-Methode

3.21.1 Prinzip

Viele Protokolle für die Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode zur Transfektion, auch das in dieser Arbeit verwendete, sind eine Modifikation des Protokolls von Graham und Van Der Eb von 1973. Änderungen wurden meistens bei der Kultur von Zellen oder dem Zeitpunkt und der Dauer der Transfektion vorgenommen (Parker und Stark 1979; Chen und Okayama 1987; Chen und Okayama 1988; Ginot *et al.* 1989; Pasco und Fagan 1989; Rippe *et al.* 1990). Allen liegt zugrunde, daß die DNA in Form von feinkörnigen Calcium-Phosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen wird. Das Präzipitat erhält man durch Mischen einer DNA/Calciumchlorid-Lösung mit einer Phosphat-haltigen Lösung.

3.21.2 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H₂O angesetzt und bei 4°C gelagert.

2 M Calciumchlorid-Lösung

 $\begin{array}{c} \text{CaCl}_2 \ x \ 2 \ \text{H}_2 \text{O} & 2 \ \text{M} & 294 \ \text{g/l} \\ \\ \text{Die Lösung wurde durch einen 0,2 } \mu\text{m-Filter sterilfiltriert und in Aliquots von 10 ml bei } -20^\circ\text{C} \\ \\ \text{gelagert.} \end{array}$

<u>2 x HEPES-Puffer</u>		
HEPES	50 mM	11,9 g/l
NaCl	280 mM	16,4 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,5 M	210 mg/l
Der Puffer wurde auf pH 7,05 eingestellt,	durch einen 0,2 µm-Filt	er sterilfiltriert und in
Aliquots von 10 ml bei –20°C gelagert.		

3.21.3 Transfektion von Hepatocyten nach der Calcium-Phosphat-Methode

Transfektionsansatz für eine Kulturschale (35 mm Ø)

Plasmid-DNA	1 µg
H ₂ O	ad 67,5 µl
2 M CaCl ₂ -Lösung	7,5 µl
2 x HEPES-Puffer	75 µl

Für Transfektionen wurde 1 μ g der Plasmid-DNA pGL3- α 2MG1500 verwendet; für Cotransfektionen zusammen mit dem Plasmid pRc/CMV-STAT3 wurde 1 μ g Plasmid-DNA mit je 150 ng Co-Plasmid-DNA eingesetzt.

Der Transfektionsansatz wurde in Polystyrolröhrchen angesetzt. Nach dem Zusammenpipettieren wurden die Lösungen durch leichtes Schwenken gemischt und dann 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bildete sich das DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitat, was durch eine leichte Trübung des Puffers zu verfolgen war. Anschließend wurde der Transfektionsansatz von 150 μ l auf 1,5 ml frisch ausplattierte Hepatocytensuspension (siehe 3.1.6) in 35 mm-Kulturschalen getropft, durch leichtes Schwenken gemischt und im Brutschrank unter 3% CO₂ inkubiert. Bei transfizierten Hepatocyten wurde 5 h nach der Transfektion sowie nach 24 h das Medium gewechselt.

3.22 Nachweis der Luciferase-Reportergen-Aktivität

3.22.1 Prinzip

Das verwendete Luciferase Assay System der Firma Promega ermöglicht den Nachweis des Enzyms Luciferase aus der nordamerikanischen Feuerfliege (Photinus pyralis) in transfizierten Zellen.

Das Luciferase-Enzym ist in der Lage unter ATP-Verbrauch und in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen mit dem Substrat Luciferin einen Luciferase-Luciferyl-AMP-Komplex zu bilden. Dieser Komplex wird in einem weiteren Reaktionsschritt oxidativ decarboxyliert und es entsteht unter Emission von Licht freie Luciferase, Oxyluciferin, AMP, Pyrophosphat sowie CO₂. Steht das Luciferase-Substrat Luciferin im Überschuß zur Verfügung, so ist die Lichtemission proportional zur Luciferasekonzentration und kann im Luminometer quantifiziert werden. Die so in Zellextrakten transfizierter Zellen quantifizierte Menge Luciferase erlaubt damit Rückschlüsse auf die Aktivität und Stärke des Promotors transfizierter Plasmide, die ein Luciferase-Reportergen tragen.

3.22.2 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit entmineralisiertem, quarzbidestilliertem H₂O angesetzt und bei 4°C gelagert.

<u>PBS</u>

Die Zusammensetzung von PBS ist unter 3.5.1 beschrieben.

Luciferase Zellkultur-Lysispuffer (1 x)	
Tris (pH 7,8)	25 mM
DTT	2 mM
1,2-Diaminocyclohexan-	2 mM
N,N,N',N'-Tetraacetat	
Glycerol	10% (v/v)
Triton X-100	1% (v/v)

Der Zellkultur-Lysispuffer war als 5 x Konzentrat dem Kit beigefügt und wurde bei -20° C gelagert. Vor Gebrauch wurde er mit H₂O verdünnt.

Luciferase Assay-Puffer

Der Puffer wurde vom Hersteller mitgeliefert, die Zusammensetzung wurde nicht bekanntgegeben.

Luciferase Assay-Substrat

Das Substrat wurde vom Hersteller mitgeliefert, die Zusammensetzung wurde nicht bekanntgegeben. Das Substrat wurde durch Zugabe von 10 ml Luciferase Assay-Puffer rekonstituiert und in Aliquots von 2 ml im Dunkeln bei –20°C gelagert.

3.22.3 Durchführung des Luciferase-Assays

Die transfizierten Hepatocyten wurden zweimal mit 1 ml PBS vorsichtig gewaschen und mit 100 µl Luciferase-Zellkultur-Lysispuffer überschichtet. Die Kulturschalen wurden 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, die Zellen abgekratzt und in Schnappdeckel-

Reaktionsgefäße überführt. Die Zellysate wurden zum besseren Zellaufschluß direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Nach dem Auftauen wurden die Zellysate 15 s bei 12 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Je 5 µl der Zellysate wurden in eine Vertiefung einer 96-Wellplatte gegeben und die Platte in ein Mikroplatten-Luminometer der Firma anthos labtec instruments, Modell lucy 1 gestellt. 25 µl des Luciferase Assay-Substrates wurden durch einen Injektor zu jeder Vertiefung gegeben und das produzierte Licht über einen Zeitraum von 10 s von einem Detektor gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Expression G_S- und G_i-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in Nichtparenchymzellen der Rattenleber

In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch RT-PCR gezeigt werden, daß die mRNAs der acht verschiedenen Prostanoidrezeptoren differentiell in den verschiedenen Zelltypen der Rattenleber exprimiert werden (Tab. 2, Seite 12; Fennekohl *et al.* 1999). Diese Ergebnisse wurden mit jeweils frisch isolierten Zellen gewonnen. Durch RT-PCR mit mRNAs aus 72 h kultivierten Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen bzw. mit mRNAs aus 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich im Verlauf der Kulturdauer die Expression der G_S- und G_i-gekoppelten Prostanoidrezeptoren ändert. Um schließlich zu erfahren, ob die auf mRNA-Ebene erhobenen Daten mit denen auf Protein-Ebene korrelieren, sollten die G_S- und G_i-gekoppelten Nichtparenchymzellen der Ratte nachgewiesen werden, da für Prostanoidrezeptoren bislang keine geeigneten Antikörper existieren, die den direkten Nachweis in primär kultivierten Zellen erlauben würden.

	KC	SEC	PSC
DP-R			
EP2-R	1		1
EP3-R			
EP4-R			
IP-R	-		
β-Actin			the second

Abb. 10: Expression der G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R aber nicht des G_i-gekoppelten EP3-R in kultivierten Nichtparenchymzellen der Ratte. Kupfferzellen (KC), sinusoidale Endothelzellen (SEC) und Perisinusoidalzellen (PSC) wurden wie unter 3.2 und 3.4 beschrieben isoliert und für 72 h (KC, SEC) bzw. 48 h (PSC) kultiviert. Aus den kultivierten Zellen wurde durch Affinitäts-Chromatographie Gesamt-RNA isoliert und durch Oligo(dT)-gestartete reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 3.11 und 3.12). 35 PCR-Cyclen wurden mit spezifischen Primern für die Prostanoidrezeptoren oder β -Actin mit seriellen Verdünnungen der cDNAs (1:1, 1:4 und 1:16) durchgeführt, um sicherzustellen, daß die PCR-Reaktion nicht gesättigt ist, ausgenommen für den DP-R, der 40 PCR-Cyclen für eine effiziente Amplifikation benötigte. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

4.1.1 Expression der mRNA von G_s- und G_j-gekoppelten Prostanoidrezeptoren in 72 h kultivierten Kupfferzellen der Ratte

Frisch isolierte Kupfferzellen der Ratte exprimierten die mRNAs der G_s -gekoppelten Prostanoidrezeptoren EP2-R und in geringerem Ausmaß auch EP4-R, IP-R und DP-R (siehe Tab. 2a). Außerdem konnte die mRNA des G_i -gekoppelten EP3-R in diesem frisch isolierten Zelltyp nachgewiesen werden. In 72 h kultivierten Kupfferzellen konnte wie in frisch isolierten Zellen die mRNA des EP2-R und des EP4-R durch RT-PCR nachgewiesen werden, in niedrigen Mengen auch die des IP-R, wohingegen der DP-R und der G_i -gekoppelte EP3-R nach 72 h Kulturdauer im Gegensatz zu frisch isolierten Kupfferzellen nicht mehr auf mRNA-Ebene detektierbar waren (Abb. 10 und Tab. 2a).

Tab. 2a: Vergleich der Expression G_S- und G_j-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in frisch isolierten und kultivierten Nichtparenchymzellen der Rattenleber. Aus frisch isolierten sowie 72 h kultivierten Kupfferzellen (KC) und sinusoidalen Endothelzellen (SEC) bzw. 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen (PSC) wurde wie in Abb. 10 beschrieben die mRNA-Expression der Prostanoidrezeptoren im Vergleich zu β -Actin bestimmt. Zum funktionellen Nachweis der G_S- und G_j-gekoppelten Prostanoidrezeptoren wurden 72 h kultivierte KC und SEC bzw. 48 h kultivierte PSC für 5 min mit den natürlichen Prostanoidrezeptor-Liganden PGE₂ und PGD₂, mit dem IP-R-spezifischen Agonisten Iloprost oder den EP2-R- bzw. EP4-R-spezifischen Agonisten ONO613 bzw. ONO604 stimuliert (siehe 3.5.2) und intrazellulär gebildetes cAMP im RIA bestimmt (siehe 3.6).

	КС		SEC		PSC				
	mRNA		cAMP	mR	NA	cAMP	mR	NA	cAMP
	frisch	72 h	72 h	frisch	72 h	72 h	frisch	48 h	48 h
DP-R:	[++]	-	-	[+]	-	-	[+++]	-	-
EP2-R:	+++	+++	$\uparrow\uparrow$	++	-	-	(+)	+	Ŷ
EP3-R:	+++	-	-	+++	-	-	++	-	?
EP4-R:	+	+	Ŷ	+++	+++	$\uparrow\uparrow$	(+)	-	-
IP-R:	(+)	+	-	++	++	-	+++	+++	$\uparrow\uparrow$

4.1.2 Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in 72 h kultivierten Kupfferzellen der Ratte

Um die G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren auch funktionell auf Kupfferzellen nachzuweisen, wurden 72 h kultivierte Kupfferzellen (siehe 3.2) für 5 min mit 10 μ M und 0,2 μ M PGE₂, PGD₂ oder lloprost, einem IP-R-Agonisten, stimuliert und die Spiegel an intrazellulärem cAMP im RIA bestimmt (siehe 3.5.2 und 3.6). Die Stimulation mit PGE₂ führte im Gegensatz zu PGD₂ und lloprost zu einem Anstieg der intrazellulärem cAMP-Konzentration, der bei einer PGE₂-Konzentration von 0,2 μ M etwas mehr als halbmaximal war (Abb. 11). Somit waren die auf mRNA-Ebene in frisch isolierten sowie 72 h kultivierten Kupfferzellen nachweisbaren PGE₂-Rezeptoren vom Subtyp EP2-R und/oder EP4-R auch funktionell nachweisbar, wohingegen der IP-R und der DP-R funktionell keine Rolle zu spielen scheinen.



Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in Abb. 11: kultivierten Kupfferzellen der Ratte. Kupfferzellen der Ratte wurden durch eine kombinierte Pronase-/Collagenase-Perfusion isoliert, über einen einstufigen Nycodenz-Dichtegradienten angereichert und über zentrifugale Elutriation gereinigt (siehe 3.2). 1,0 x 10⁶ Zellen wurden in eine Vertiefung einer 24-Wellplatte gegeben und 72 h mit einem Mediumwechsel nach 24 h und 48 h in RPMI mit 30% (v/v) NCS und 1% (v/v) Antibiotika kultiviert (siehe 3.2). Nach 72 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 10 µM und 0,2 µM PGE₂, PGD₂ und lloprost wurden für 5 min zugegeben, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten aus den Differenzen zwischen dem jeweiligen Wert und der Kontrolle (= unstimulierte Kupfferzellen).

Mit Hilfe eines EP2-R-spezifischen Agonisten (ONO613) und eines EP4-R-spezifischen Agonisten (ONO604) konnte in einer funktionellen Analyse zwischen den beiden G_{s} -gekoppelten PGE₂-Rezeptor-Subtypen EP2-R und EP4-R unterschieden werden. Stimulation von 72 h kultivierten Kupfferzellen mit ONO613 (EP2-R-Agonist) und ONO604 (EP4-R-Agonist) in Konzentrationen, in denen sie den jeweils anderen PGE₂-Rezeptor-Subtyp nicht aktivieren, führte mit beiden Agonisten zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg, wobei die cAMP-Antwort durch den EP2-R-spezifischen Agonisten stärker ausfiel als durch den EP4-R-spezifischen Agonisten (Abb. 12). Dieses Ergebnis stimmt mit den RT-PCR-Daten aus 72 h kultivierten Kupfferzellen überein. Beide G_{s} -gekoppelten PGE₂-Rezeptoren, EP2-R und EP4-R, konnten hier auf mRNA-Ebene identifiziert werden (Abb. 10).



Abb. 12: EP2-Rezeptor- und EP4-Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in kultivierten Kupfferzellen der Ratte. Kupfferzellen der Ratte wurden wie in Abb. 11 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.2). Nach 72 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 100 nM PGE₂, 1 μ M EP2-R-Agonist (ONO613) oder 10 nM EP4-R-Agonist (ONO604) wurden für 5 min zugegeben, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten; *p < 0,05, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben.

Pertussistoxin unterdrückt die EP3-R-vermittelte Signalkette durch Inhibition des an den EP3-R gekoppelten G_i-Proteins und damit dessen inhibitorische Wirkung auf eine Hormonstimulierte cAMP-Bildung. Für denselben Liganden, PGE₂, wurden auf mRNA-Ebene in frisch isolierten Kupfferzellen zwei funktionell antagonistische Gruppen von Rezeptoren nachgewiesen, die G_S-gekoppelten EP2-R und EP4-R und der G_i-gekoppelte EP3-R (Tab. 2a). Während die beiden G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren auch in 72 h kultivierten Kupfferzellen auf mRNA-Ebene nachweisbar waren, war die mRNA des EP3-R nicht mehr vorhanden (Abb. 10 und Tab. 2a).

In Pertussistoxin-vorbehandelten kultivierten Kupfferzellen (siehe 3.5.2) führte die Stimulation mit PGE₂ nicht zu einer signifikant höheren Steigerung der cAMP-Konzentration gegenüber nicht mit Pertussistoxin behandelten Kupfferzellen (Abb. 13). Dieses durch funktionelle Analyse erzielte Ergebnis stimmt mit dem durch RT-PCR aus 72 h kultivierten Kupfferzellen überein, in denen die mRNA des EP3-R im Gegensatz zu frisch isolierten Zellen nicht mehr nachzuweisen war (Abb. 10 und Tab. 2a). Die Diskrepanz zwischen dem Nachweis des EP3-R in frisch isolierten Kupfferzellen und dem Fehlen der Rezeptor-mRNA sowie einer funktionellen Aktivität in 72 h kultivierten Kupfferzellen könnte einerseits dadurch erklärt werden, daß es im Zuge der Kultivierung zu einer Verminderung der Rezeptor-Genaktivität kam, welches zu einem Absinken der Expression des EP3-R führte. Außerdem könnte die Rezeptor mRNA durch RNasen oder das Rezeptor-Protein durch Proteasen mehr degradiert werden. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, daß die frisch isolierte Kupfferzell-Präparation während der Isolation durch RNA anderer Leberzellen, wie z. B. Hepatocyten kontaminiert wurde. Sowohl frisch isolierte Hepatocyten (Tab. 2a) als auch 36 h kultivierte Hepatocyten exprimieren den EP3-Rezeptor (nicht gezeigt). Gegen diese Möglichkeit spricht, daß der exklusiv in Hepatocyten exprimierte FP-Rezeptor dagegen in keinem Nichtparenchymzelltyp zu finden war (Tab. 2).

Die fehlende Steigerung der cAMP-Bildung in Pertussistoxin-vorbehandelten kultivierten Kupfferzellen durch PGE₂ könnte auch dadurch erklärt werden, daß das Pertussistoxin nicht wirksam war. Gegen diese Annahme spricht das Ergebnis, das mit Pertussistoxin-vorbehandelten kultivierten Hepatocyten erzielt wurde (Abb. 28). In diesem Zelltyp kam es durch PGE₂ zu einer weiteren Zunahme der cAMP-Bildung nach Pertussistoxin-Behandlung. Im Gegensatz zu PGE₂ steigerten PGD₂ und Iloprost die cAMP-Bildung in Kupfferzellen nicht (Abb. 11). Für Iloprost korreliert dieses Ergebnis nicht mit dem der RT-PCR, das IP-R-mRNA sowohl in frisch isolierten als auch in 72 h kultivierten Kupfferzellen zeigte. Dies könnte eine Folge einer Kontamination der Kupfferzellen mit sinusoidalen Endothelzellen oder Perisinusoidalzellen sein. Beide Zelltypen wiesen frisch isoliert (Tab. 2a), aber auch nach 72 h Kulturdauer (Abb. 10 und Tab. 2a) hohe Spiegel an IP-R-mRNA auf. Die mRNA des DP-R war durch RT-PCR in frisch isolierten Kupfferzellen nur durch eine extrem hohe Anzahl von 40 PCR-Cyclen nachzuweisen, während in 72 h kultivierten Zellen auch nach

40 PCR-Cyclen keine DP-R-mRNA detektierbar war, was die fehlende cAMP-Bildung nach PGD₂-Stimulation in kultivierten Kupfferzellen erklärt.

Die durch RT-PCR und funktioneller Analyse erzielten Ergebnisse deuten daraufhin, daß der EP2-R in Kupfferzellen der Ratte der wichtigste G_s-gekoppelte Prostanoidrezeptor ist.



Abb. 13: PGE₂-abhängige cAMP-Bildung in kultivierten Kupfferzellen der Ratte. Kupfferzellen wurden wie unter Abb. 11 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.2). Nach 48 h wurde für weitere 24 h Pertussistoxin (100 ng/ml) zu Kulturen gegeben. Nach 72 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 10 µM und 0,2 µM PGE₂ wurden für 5 min zugegeben, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten; ns = nicht signifikant, a: p = 0,113; b: p = 0,385, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben.

4.1.3 Expression der mRNA von G_S- und G_j-gekoppelten Prostanoidrezeptoren in 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte

Frisch isolierte sinusoidale Endothelzellen der Ratte exprimieren die mRNAs der G_{S} -gekoppelten Prostanoidrezeptoren EP2-R, EP4-R und IP-R und in geringerem Ausmaß auch die mRNA des DP-R (Tab. 2a). Außerdem konnte auch die mRNA des G_{i} -gekoppelten EP3-R in diesem Zelltyp nachgewiesen werden. Während in 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen die mRNAs des EP4-R und des IP-R nachzuweisen waren, konnten die mRNAs des DP-R und des EP3-R nicht detektiert werden (Abb. 10 und Tab. 2a).



Abb. Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung 14: in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte. Sinusoidale Endothelzellen der Ratte wurden durch eine kombinierte Pronase-/Collagenase-Perfusion isoliert, über einen einstufigen Nycodenz-Dichtegradienten angereichert und über zentrifugale Elutriation gereinigt (siehe 3.2). 2,0 x 10⁶ Zellen wurden in eine Vertiefung einer 24-Wellplatte gegeben und 72 h mit einem Mediumwechsel nach 24 h und 48 h in M199 mit 30% (v/v) NCS und 1% (v/v) Antibiotika kultiviert (siehe 3.2). Nach 72 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 10 µM und 0,2 µM PGE2, PGD2 und lloprost wurden für 5 min zugegeben, der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten aus den Differenzen zwischen dem jeweiligen Wert und der Kontrolle (= unstimulierte Endothelzellen).

4.1.4 Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte

Um die G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren auch funktionell auf sinusoidalen Endothelzellen nachzuweisen, wurden 72 h kultivierte sinusoidale Endothelzellen (siehe 3.2) für 5 min mit 10 μ M und 0,2 μ M PGE₂, PGD₂ oder Iloprost, einem IP-R-Agonisten, stimuliert und die Spiegel an intrazellulärem cAMP im RIA bestimmt (siehe 3.5.2 und 3.6). Die Stimulation mit PGE₂ führte wie in Kupfferzellen zu einem Anstieg an intrazellulärem cAMP (Abb. 14).



Abb. 15: EP2-Rezeptor- und EP4-Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte. Sinusoidale Endothelzellen der Ratte wurden wie in Abb. 14 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.2). Nach 72 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 100 nM PGE₂, 1 μ M EP2-R-Agonist (ONO613) oder 10 nM EP4-R-Agonist (ONO604) wurden für 5 min zugegeben, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten; *p < 0,05, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben.

Mit Hilfe eines EP2-R-spezifischen Agonisten (ONO613) und eines EP4-R-spezifischen Agonisten (ONO604) konnte in einer funktionellen Analyse zwischen den beiden G_{s} -gekoppelten PGE₂-Rezeptor-Subtypen EP2-R und EP4-R unterschieden werden. Stimulation von 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen mit ONO613 (EP2-R-Agonist)

und ONO604 (EP4-R-Agonist) führte nur bei dem EP4-R-spezifischen Agonisten ONO604 zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg, während der EP2-R-spezifische Agonist ONO613 keine cAMP-Antwort auslöste (Abb. 15). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Expression der mRNAs der beiden G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren in 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen. Hier konnte zwar wie in frisch isolierten Zellen der EP4-R nachgewiesen werden, der EP2-R jedoch nicht mehr (Abb. 10 und Tab. 2a).



Abb. 16: PGE₂-abhängige cAMP-Bildung in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen der Ratte. Sinusoidale Endothelzellen der Ratte wurden wie unter Abb. 14 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.2). Nach 48 h wurde für weitere 24 h Pertussistoxin (100 ng/ml) zu Kulturen gegeben. Nach 72 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 10 μ M und 0,2 μ M PGE₂ wurden für 5 min zugegeben, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6.). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten; ns = nicht signifikant, a: p = 0,157; b: p = 0,332, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben.

In Pertussistoxin-vorbehandelten sinusoidalen Endothelzellen (siehe 3.5.2) führte die Stimulation mit PGE₂ zwar zu einem höheren Anstieg in intrazellulärem cAMP als in nicht mit Pertussistoxin behandelten Endothelzellen, dieser war jedoch nicht signifikant (Abb. 16). Die Wirksamkeit des Pertussistoxin konnte in den funktionellen Studien mit kultivierten Hepatocyten (Abb. 28) bewiesen werden. Somit scheint der EP3-R in sinusoidalen Endothelzellen wie in Kupfferzellen keine größere funktionelle Bedeutung zu haben. Wie in Kupfferzellen war der EP3-R nach 72 h Kulturdauer in sinusoidalen Endothelzellen nicht mehr zu finden (Abb. 10 und Tab. 2a), was mit dem funktionellen Ergebnis übereinstimmt. Grund hierfür könnte sein, daß es, wie unter 4.1.2 im Falle der Kupfferzellen bereits erwähnt, im Verlauf der Kultivierung der Zellen zu einer Veränderung der Genaktivität kommen kann, die mRNA der Rezeptoren durch RNasen oder das Rezeptor-Protein durch Proteasen vermehrt abgebaut wird. Der EP3-R konnte auch funktionell nicht nachgeweisen werden (Abb. 16).

Wie in Kupfferzellen (Abb. 11) steigerten PGD_2 und lloprost im Gegensatz zu PGE_2 die cAMP-Bildung in sinusoidalen Endothelzellen nicht (Abb. 14). Daß es nach Stimulation mit dem IP-R-Agonisten lloprost zu keinem cAMP-Anstieg kam, paßt nicht in das Bild der mit RT-PCR von frisch isolierten sowie 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen gesammelten Daten, die einen hohen Spiegel an IP-R-mRNA aufwiesen (Tab. 2 und Abb. 10). Daß PGD₂ keine cAMP-Bildung hervorruft, korreliert mit den RT-PCR-Daten aus 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen, in denen auch nach 40 PCR-Cyclen die mRNA des DP-R nicht nachzuweisen war (Abb. 10), obwohl dieser G_s -gekoppelte Prostanoidrezeptor in frisch isolierten zu finden war (Tab. 2a).

Die Daten aus den RT-PCR-Experimenten und den funktionellen Studien lassen vermuten, daß in sinusoidalen Endothelzellen der EP4-R der bedeutsamste Prostanoidrezeptor ist.

4.1.5 Expression der mRNA von G_s- und G_j-gekoppelten Prostanoidrezeptoren in 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte

Frisch isolierte Perisinusoidalzellen der Ratte exprimierten die mRNA des G_s -gekoppelten IP-R in hohen Spiegeln, wohingegen die mRNAs der G_s -gekoppelten EP2-R, EP4-R und DP- R nur in sehr geringen Mengen nachweisbar waren (siehe Tab. 2a). Außerdem konnte auch die mRNA des G_i -gekoppelten EP3-R in diesem frisch isolierten Zelltyp nachgewiesen werden. In 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen war die mRNA des IP-R immer noch in hohen Spiegeln vorhanden und die des EP2-R war auch nachweisbar, eine Expression der DP-R-, EP3-R- und EP4-R-mRNA konnte jedoch wie in 72 h kultivierten Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen nicht mehr gezeigt werden (Abb. 10 und Tab. 2a).

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen der EP4-R-mRNA in kultivierten Perisinusoidalzellen könnte sein, daß die frisch präparierte Perisinusoidalzell-Fraktion kontaminiert war durch

sinusoidale Endothelzellen, die große Mengen an EP4-R-mRNA enthalten (Abb. 10). Da sinusoidale Endothelzellen sich unter den Kulturbedingungen für Perisinusoidalzellen nicht an die Zellkulturschale anheften, konnte durch die Kultivierung der Perisinusoidalzellen diese Kontamination jedoch so gering gehalten werden, daß die mRNA des EP4-R nicht mehr detektiert werden konnte.



Prostanoid-vermittelter Anstieg Abb. 17: der cAMP-Bildung in kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte. Perisinusoidalzellen der Ratte wurden durch eine kombinierte Pronase-/Collagenase-Perfusion isoliert und über einen einstufigen Nycodenz-Dichtegradienten angereichert (siehe 3.4). 0,5 x 10⁶ Zellen wurden in eine Vertiefung einer 24-Wellplatte gegeben und 48 h mit einem Mediumwechsel nach 24 h in RPMI mit 30% (v/v) NCS und 1% (v/v) Antibiotika kultiviert (siehe 3.4). Nach 48 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 10 µM und 0,2 µM PGE₂, PGD₂ und Iloprost wurden für 5 min zugegeben, der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten aus den Differenzen zwischen dem jeweiligen Wert und der Kontrolle (= unstimulierte Perisinusoidalzellen).

4.1.6 Prostanoid-vermittelter Anstieg der cAMP-Bildung in 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte

Für den funktionellen Nachweis der G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren wurden 48 h kultivierte Perisinusoidalzellen (siehe 3.4) für 5 min mit 10 μ M und 0,2 μ M PGE₂, PGD₂ oder Iloprost, stimuliert und die Spiegel an intrazellulärem cAMP im RIA bestimmt (siehe 3.5.2 und

3.6). Wie bei Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen (Abb. 11 und Abb. 14) führte die Stimulation mit PGE₂ zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration, der aber im Gegensatz zu Kupffer- und Endothelzellen bei einer PGE₂-Konzentration von 0,2 μ M deutlich weniger als halbmaximal war (Abb. 17).



Abb. 18: EP2-Rezeptor- und EP4-Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte. Perisinusoidalzellen der Ratte wurden wie in Abb. 17 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.2). Nach 48 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPES-gepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 100 nM PGE₂, 1 μ M EP2-R-Agonist (ONO613) oder 10 nM EP4-R-Agonist (ONO604) wurden für 5 min zugegeben, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten; *p < 0,05, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben.

Wiederum sollte durch den EP2-R-spezifischen Agonisten (ONO613) und den EP4-Rspezifischen Agonisten (ONO604) in einer funktionellen Analyse zwischen den beiden G_Sgekoppelten PGE₂-Rezeptor-Subtypen EP2-R und EP4-R unterschieden werden. Stimulation von 48 h Perisinusoidalzellen mit ONO613 (EP2-R-Agonist) und ONO604 (EP4-R-Agonist) führte nur bei dem EP2-R-spezifischen Agonisten ONO613 zu einem ähnlich starken intrazellulären cAMP-Anstieg wie nach PGE₂, während der EP4-R-spezifische Agonist ONO604 keine cAMP-Antwort auslöste (Abb. 18). Dieses funktionelle Ergebnis stimmte mit dem der RT-PCR aus kultivierten Perisinusoidalzellen überein, bei denen zwar die mRNA des EP2-R, nicht jedoch die des EP4-R nachweisbar waren (Abb. 10 und Tab. 2a).

Der IP-R-Agonist Iloprost, der in Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen die cAMP-Bildung nicht gesteigert hatte, stimulierte dagegen die cAMP-Bildung in Perisinusoidalzellen (Abb. 17). Bei einer Iloprost-Konzentration von 0,2 μ M war die cAMP-Bildung etwa halbmaximal. PGD₂ stimulierte die cAMP-Bildung in Perisinusoidalzellen nicht (Abb. 17). Diese funktionellen Ergebnisse stimmen mit denen auf mRNA-Ebene von 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen überein. Hier konnten die mRNAs der beiden G_s-gekoppelten Prostanoidrezeptoren IP-R und EP2-R nachgewiesen werden (Abb. 10 und Tab. 2a).



Abb. 19: PGE₂-abhängige cAMP-Bildung in kultivierten Perisinusoidalzellen der Ratte. Perisinusoidalzellen der Ratte wurden wie unter Abb. 17 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.4). Nach 24 h wurde für weitere 24 h Pertussistoxin (100 ng/ml) zu Kulturen gegeben. Nach 48 h Kulturdauer wurde das Medium in drei Waschschritten mit HEPESgepufferter HBSS entfernt und die Zellen in diesem Puffer 10 min bei 37°C vorinkubiert. 10 µM und 0,2 µM PGE2 wurden für 5 min zugegeben, der Überstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 65% (v/v) Ethanol aufgeschlossen (siehe 3.5.2). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten; ns = nicht signifikant, a : p = 0,063; b: p = 0,008, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben.

In Pertussistoxin-vorbehandelten Perisinusoidalzellen führte die Stimulation mit PGE₂ nur in einer Konzentration von 10 μ M zu einem signifikant höheren Anstieg von intrazellulärem cAMP als in unstimulierten (Abb. 19). Der EP3-R könnte gemäß dieser funktionellen Daten in diesem Zelltyp doch nach 48 h Kultur exprimiert werden, obwohl die mRNA des EP3-R in den kultivierten Perisinusoidalzellen im Gegensatz zu frisch isolierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 10 und Tab. 2a).

Die Daten deuten daraufhin, daß in Perisinusoidalzellen der IP-R der funktionell bedeutsamste G_s-gekoppelte Prostanoidrezeptor ist.

Ein Vergleich der Expression der mRNAs von G_{s} - und G_{i} -gekoppelten Prostanoidrezeptoren in frisch isolierten gegenüber kultivierten Nichtparenchymzellen zeigte also, daß es im Verlauf einer Standard-Kultivierung von Nichtparenchymzellen zu einem Verlust der Rezeptorexpression kommen kann. Dies konnte für den EP3-R und DP-R in allen drei Nichtparenchymzell-Typen gezeigt werden.

4.2 Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung durch PGE₂ in Kupfferzellen EP2-R- oder EP4-R-defizienter Mäuse

PGE₂ inhibiert die LPS-stimulierte Bildung von TNF α in Kupfferzellen. Für die LPS-induzierte Freisetzung von TNF α existiert eine autokrine negative Rückkopplungsschleife: Sowohl LPS als auch TNF α stimulieren die Freisetzung von PGE₂ aus Kupfferzellen. PGE₂ wiederum kann die Produktion von TNF α über einen Anstieg an intrazellulärem cAMP vermindern (Peters *et al.* 1990). Für diesen PGE₂-vermittelten cAMP-Anstieg könnten sowohl der G_S-gekoppelte EP2-R als auch der G_S-gekoppelte EP4-R verantwortlich sein. Die mRNAs beider Rezeptoren konnte in Kupfferzellen der Ratte nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser beiden PGE₂-Rezeptoren für die Inhibition der LPS-induzierten TNF α -Bildung sollte mit Hilfe von Mäusen untersucht werden, die durch homologe Rekombination defizient in jeweils einem der beiden Rezeptoren sind (Hizaki *et al.* 1999; Segi *et al.* 1998) und die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Ichikawa (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universität Kyoto) zur Verfügung gestellt wurden.

 4.2.1 Expression der mRNA der G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R in
72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-Rdefizienten Mäusen

In vorangegangenen Untersuchungen sowie in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß frisch isolierte, aber auch 72 h kultivierte Kupfferzellen der Ratte die beiden G_{S^-} gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R exprimierten (Tab. 2a und Abb. 10). Da

es aber Speziesunterschiede in der Expression von Prostanoidrezeptoren geben könnte, sollte untersucht werde, ob Kupfferzellen der Maus ebenfalls beide Rezeptoren exprimieren. Dafür wurde aus 72 h kultivierten Kupfferzellen (siehe 3.3) aus Kontrollmäusen, aus EP2-Rund EP4-R-defizienten Mäusen Gesamt-RNA isoliert und die mRNAs der beiden Prostanoidrezeptoren im Vergleich mit β -Actin durch RT-PCR quantifiziert (siehe 3.11 und 3.12).

72 h kultivierte Kupfferzellen aus Kontrollmäusen (EP2+/+ und EP4+/+) enthielten sowohl die mRNA des EP2-R als auch die des EP4-R (Abb. 20). Wie erwartet konnte die mRNA des EP2-R nicht in EP2-R-defizienten Kupfferzellen und die mRNA des EP4-R nicht in EP4-R-defizienten Kupfferzellen nachgewiesen werden. Durch die Knock-outs kam es nicht zu einer kompensatorischen Überexpression der mRNA des EP2-R in EP4-R-defizienten Kupfferzellen und nicht zu einer Überexpression der mRNA des EP4-R in Kupfferzellen EP2-R-defizienten Kupfferzellen und nicht zu einer Überexpression der mRNA des EP4-R in Kupfferzellen EP2-R-defizienter Mäuse (Abb. 20).

		EP2-R mRNA-Expression							
		EP2+/+	EP2+/+ EP2-/- EP4+/+ EP4-/-						
E	EP2-R	1		1					
	3-Actin								
		EP4-R mRNA-Expression							
		EP2+/+ EP2-/- EP4+/+ EP4-/-							
E	EP4-R		I.						
	3-Actin								

Abb. 20: Expression der G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen. Aus Kontrollmäusen (EP2+/+ und EP4+/+) sowie aus EP2-R-defizienten (EP2-/-) bzw. EP4-R-defizienten (EP4-/-) Mäusen wurden Kupfferzellen durch kombinierte Pronase-/Collagenase-Perfusion isoliert und über einen zweistufigen Dichtegradienten angereichert (siehe 3.3). Die Zellen wurden für 72 h in RPMI mit 30% (v/v) NCS und 1% (v/v) Antibiotika kultiviert. Aus so kultivierten Kupfferzellen wurde durch Affinitäts-Chromatographie Gesamt-RNA isoliert und diese durch Oligo(dT)-gestartete reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 3.11 und 3.12). 35 PCR-Cyclen wurden mit spezifischen Primern für den EP2-R und EP4-R oder β -Actin mit seriellen Verdünnungen der cDNAs (1:1, 1:4 und 1:16) durchgeführt, um sicherzustellen, daß die PCR-Reaktion nicht gesättigt ist.



Abb. 21: Inhibition der LPS-induzierten TNFα-Bildung in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen. Kupfferzellen wurden aus Kontrollmäusen (EP+/+), EP2-R-defizienten (EP2-/-) und EP4-R-defizienten (EP4-/-) wie in Abb. 20 beschrieben isoliert (siehe 3.3). Kupfferzellen wurden für 72 h in RPMI mit 30% (v/v) NCS und 1% (v/v) Antibiotika kultiviert und dann in Serum-freiem Medium für 6 h stimuliert mit LPS (100 ng/ml), LPS + 10 µM Indomethacin, LPS + 100 nM PGE₂, LPS + 10 µM des EP2-R-Agonisten ONO613 (EP2-R-Ag) oder LPS + 10 nM des EP4-R-Agonisten ONO604 (EP4-R-Ag) (siehe 3.5.6). TNFα-Konzentrationen wurden in den Zellkulturüberständen im ELISA bestimmt (siehe 3.8). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 7-24 Bestimmungen. Statistik: Student's *t*-test für ungepaarte Proben; a: signifikant unterschiedlich von LPS-stimulierten Kupfferzellen derselben Gruppe.

4.2.2 Inhibition der LPS-induzierten TNFα-Bildung in 72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen

Zur Untersuchung der Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung durch PGE₂ wurden 72 h kultivierte Kupfferzellen (siehe 3.3) aus Kontrollmäusen, aus EP2-R- und EP4-R- defizienten Mäusen für 6 h in Serum-freien Medium stimuliert mit LPS (100 ng/ml),

LPS + 10 μ M Indomethacin, LPS + 100 nM PGE₂, LPS + 10 μ M des EP2-R-Agonisten ONO613 oder LPS + 10 nM des EP4-R-Agonisten ONO604 (siehe 3.5.6). Anschließend wurden die Konzentrationen von TNF α in den Zellkulturüberständen im ELISA bestimmt (siehe 3.8).

Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R- und EP4-R-defizienten Mäusen produzierten ohne Stimulation keine signifikanten Mengen TNF α (Abb. 21). Die Inkubation mit LPS über einen Zeitraum von 6 h jedoch führte zu einer deutlichen Freisetzung von TNF α in den Zellkulturüberstand, wobei die TNF α -Spiegel in EP4-R-defizienten Kupfferzellen höher waren als in Kontrollzellen oder in Kupfferzellen EP2-R-defizienter Mäuse (Abb. 21). Die Spiegel der endogenen PGE₂-Produktion nach Stimulation der Zellen mit LPS wurden durch Messung der freigesetzten PGE₂-Konzentration im Zellkulturüberstand im RIA gemessen (Tab. 7) (siehe 3.7). Die PGE₂-Konzentrationen lagen mit ca. 5 nM deutlich unter der exogen zugeführten Konzentration. Sie variierten nicht signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen.

Tab. 7: Endogene PGE₂-Produktion in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen nach 6 h Stimulation mit LPS. Kupfferzellen wurden aus Kontrollmäusen (EP+/+), EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten wie in Abb. 16 beschrieben isoliert (siehe 3.4). Kupfferzellen wurden für 72 h in RPMI mit 30% (v/v) NCS und 1% (v/v) Antibiotika kultiviert und dann in Serum-freiem Medium für 6 h stimuliert mit 100 ng/ml LPS. PGE₂-Konzentrationen wurden in den Zellkulturüberständen im RIA bestimmt (siehe 3.7). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei Bestimmungen.

	PGE ₂ -Akkumulation nach LPS (6 h)
	[nM]
Kontrollzellen (EP2+/+, EP4+/+):	5,1 ± 0,59
EP2-R-defiziente Kupfferzellen:	4,22 ± 1,04
EP4-R-defiziente Kupfferzellen:	5,89 ± 0,85

10 μ M Indomethacin, das durch Hemmung der Cyclooxygenase die endogene LPS/TNF α stimulierte PGE₂-Synthese inhibiert, verstärkte die TNF α -Freisetzung in Kontrollzellen und EP2-R-defizienten Kupfferzellen, blieb aber ohne Wirkung in EP4-R-defizienten Kupfferzellen (Abb. 21). Exogen zugegebenes PGE₂ in einer Konzentration von 100 nM hemmte die LPSinduzierte TNF α -Freisetzung in Kupfferzellen aus Kontrollmäusen zu fast 90%. Diese PGE₂abhängige Inhibition der LPS-induzierten TNF α -Freisetzung war in EP2-R-defizienten Kupfferzellen ähnlich effektiv, wohingegen sie in Kupfferzellen aus EP4-R-defizienten Mäusen deutlich weniger effektiv war. In diesen Zellen inhibierte PGE₂ die LPS-stimulierte TNF α -Produktion zu nur 50 % (Abb. 21).

Um auszuschließen, daß nur der EP2-R in EP4-R-defizienten Kupfferzellen und nur der EP4-R in EP2-R-defizienten Kupfferzellen die LPS-induzierte Freisetzung von TNF α inhibiert, wurde die Inhibition der LPS-induzierten TNF α -Freisetzung mit Agonisten untersucht, die spezifisch für den EP2-R (ONO613) oder spezifisch für den EP4-R (ONO604) sind (Tab. 8). Der EP2-R-spezifische Agonist ONO613 bzw. der EP4-R-spezifische Agonist ONO604 in Konzentrationen, in denen sie den EP4-R bzw. den EP2-R nicht aktivieren, inhibierten in Kupfferzellen aus Kontrollmäusen die LPS-induzierte TNF α -Freisetzung in einem ähnlichen Ausmaß wie PGE₂ (Abb. 21). Wie erwartet konnte der EP2-R-spezifische Agonist die TNF α -Bildung nicht in EP2-R-defizienten Kupfferzellen inhibieren, verminderte jedoch in EP4-R-defizienten Kupfferzellen wie PGE₂ die TNF α -Bildung. Während der EP4-R-spezifische Agonist die TNF α -Freisetzung nicht in EP2-R-defizienten Kupfferzellen verminderte ner Verminderte in Kupfferzellen Kupfferzellen wie PGE₂ die TNF α -Bildung. Während der EP4-R-spezifische Agonist die TNF α -Freisetzung nicht in EP4-R-defizienten Kupfferzellen verminderte ner Verminderte ner Verminderte in EP4-R-defizienten Kupfferzellen verminderte ner Verm

Tab. 8: Bindungsaffinitäten des EP2-R-spezifischen Agonisten ONO613 und des EP4-R-spezifischen Agonisten ONO604 für die in CHO-Zellen exprimierten angegeben PGE2-Rezeptoren. Aus CHO-Zellen, die die angegebenen PGE2-Rezeptoren exprimieren, wurden Membranen gereinigt, in [³H]-PGE2-Bindungsstudien eingesetzt und die K_i-Werte (in μ M) bestimmt (Kiriyama et al. 1997).

Rezeptor	EP1-R	EP2-R	EP3-R	EP4-R
[³ H]-Ligand	[³ H]-PGE ₂			
	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]
PGE ₂	0,018	0,038	0,005	0,0031
ONO613	> 10	0,092	> 10	> 10
ONO604	0,61	0,28	1,5	0,0007

4.2.3 Dosiswirkung der Inhibition der LPS-induzierten TNFα-Bildung durch PGE₂ in 72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-Rdefizienten Mäusen

Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der PGE_2 -vermittelten Inhibition der LPSstimulierten TNF α -Freisetzung wurden Kupfferzellen (siehe 3.3) aus Kontrollmäusen, EP2-Rund EP4-R-defizienten Mäusen für 72 h kultiviert, unter Serum-freien Bedingungen 6 h mit 100 ng/ml LPS zusammen mit ansteigenden Konzentrationen an PGE₂ stimuliert und TNF α in den Zellkulturüberständen im ELISA bestimmt (siehe 3.5.6 und 3.8).

Die EC50 für die Inhibition der LPS-induzierten TNF α -Bildung durch exogenes PGE₂ lag in Kupfferzellen aus Kontrollmäusen sowie in Kupfferzellen aus EP2-R-defizienten Mäusen bei 10 nM (Abb. 22). Eine 10-fach höhere EC50 von 100 nM konnte für Kupfferzellen aus EP4-R-defizienten Mäusen bestimmt werden. Dies ist im Einklang mit der etwa 10-fach höheren Affinität des EP4-R für PGE₂ im Vergleich zum EP2-R (Tab. 8).



Abb. 22: Dosiswirkung der Inhibition der LPS-induzierten TNF α -Bildung durch PGE₂ in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen. Kupfferzellen wurden isoliert und für 72 h kultiviert wie in Abb. 20 beschrieben (siehe 3.3). Kupfferzellen aus Kontrollmäusen (EP+/+), EP2-R-defizienten (EP2-/-) und EP4-R-defizienten (EP4-/-) Mäusen wurden für 6 h in Serum-freiem Medium stimuliert mit LPS (100 ng/ml) ± PGE₂ in den angegeben Konzentrationen (siehe 3.5.6). TNF α -Konzentrationen in Zellkulturüberständen wurden im ELISA bestimmt (siehe 3.8). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 57 (Kontrollzellen) oder 25 (EP2-/- und EP4-/-Zellen) Bestimmungen als Prozent der TNF α -Konzentrationen in Überständen LPS-stimulierter Zellen. 100%-Werte ± SD sind 1393 ± 436 pg/ml, 1785 ± 848 pg/ml und 1936 ± 603 pg/ml für Kontrollzellen, EP2-/- Zellen bzw. EP4-/- Zellen.

4.2.4 Zeitabhängigkeit der LPS-induzierten TNFα-Bildung und deren Inhibition durch PGE2 in 72 h kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-Rdefizienten Mäusen

Der EP4-R zeigt eine schnelle Desensitierung nach Agonistenzugabe, der EP2-R jedoch nicht (Nishigaki *et al.* 1996). Deswegen wurde vermutet, daß der EP4-R verantwortlich sein

könnte für die frühe Antwort auf PGE₂, während der EP2-R den inhibitorischen Effekt auf die LPS-stimulierte TNF α -Freisetzung erst zu späteren Zeitpunkten vermittelt. Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der LPS-induzierten TNF α -Bildung unterstützte diese Vermutung jedoch nicht (Abb. 23).

Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen (siehe 3.3) wurden mit 100 ng/ml LPS für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h und 40 h inkubiert und TNF α im Zellkulturüberstand bestimmt (siehe 3.5.6 und 3.8). Die TNF α -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen stiegen nach Stimulation mit LPS bis zu einem Maximum nach 8 h an (Abb. 23) und sanken dann stetig bis zu den basalen Spiegeln in Kupfferzellen aus Kontrollmäusen und aus EP2-R-defizienten Mäusen. In Kupfferzellen EP4-R-defizienter Mäuse jedoch blieben die TNF α -Konzentrationen erhöht, was darauf hinweist, daß endogenes PGE₂ die LPS-stimulierte TNF α -Bildung prinzipiell über den EP4-R auch über längere Zeiträume inhibiert. Exogen zugegebenes PGE₂ in einer Konzentration von 100 nM inhibierte die LPS-induzierte TNF α -Bildung in allen Gruppen von Kupfferzellen über den gesamten untersuchten Zeitraum ähnlich gut (Abb. 23).



Abb. 23: Zeitabhängigkeit der LPS-induzierten TNF α -Bildung und deren Inhibition durch PGE₂ in kultivierten Kupfferzellen aus Kontrollmäusen, EP2-R-defizienten und EP4-R-defizienten Mäusen. Kupfferzellen wurden aus Kontrollmäusen (EP+/+), EP2-R-defizienten (EP2-/-) und EP4-R-defizienten (EP4-/-) Mäusen isoliert und kultiviert wie in Abb. 20 beschrieben (siehe 3.3). Sie wurden für 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 76 h, 70 h und 48 h vor der Zugabe von 100 ng/ml LPS ± 100 nM PGE₂ kultiviert. Die Kultur wurde für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h und 40 h in Anwesenheit von LPS ± 100 nM PGE₂ in Serum-freiem Medium weitergeführt (siehe 3.5.6). Nach insgesamt 88 h wurden die Überstände abgenommen und TNF α im ELISA bestimmt (siehe 3.8). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus 25 bis 57 Bestimmungen.

4.3 Induktion G_S-gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in Hepatocyten der Ratte durch IL-6

In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch RT-PCR gezeigt werden, daß in frisch isolierten Hepatocyten keiner der G_s -gekoppelten Prostanoidrezeptoren (DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R) exprimiert wird (Tab. 2, Fennekohl *et al.* 1999). Dieses Ergebnis war sehr interessant, da einige Arbeitsgruppen in der Literatur wiederholt von einem Prostaglandinabhängigen Anstieg von intrazellulärem cAMP in Hepatocyten berichteten (Melin *et al.* 1988; Wincek *et al.* 1975). Da jedoch andere Arbeitsgruppen, unter anderem auch die eigene, diese Ergebnisse nicht reproduzieren konnten (Refsnes *et al.* 1995; Püschel *et al.* 1993), sollte untersucht werden, ob die Expression G_s -gekoppelter Prostanoidrezeptoren induziert werden kann, z. B. während der Akutphase-Reaktion. Es wurde nämlich gezeigt (Deak *et al.* 1997; Arola *et al.* 1980), daß auch nur geringe Streßsituationen bei einem Versuchstier, z. B. die Narkose-Injektion vor einem Experiment, die Akutphase-Reaktion in gewissem Ausmaß auslösen kann. Da Interleukin-6 ein Schlüsselcytokin bei Entzündungsreaktionen darstellt, wurden primär kultivierte Hepatocyten mit IL-6 behandelt und die Expression der G_s -gekoppelten Prostanoidrezeptoren untersucht.

4.3.1 Zeitabhängigkeit der IL-6-induzierten Expression G_S-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Induktion G_s -gekoppelter Prostanoidrezeptoren wurden kultivierte Hepatocyten für 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 20 h unter Serum-freien Bedingungen mit 100 ng/ml IL-6 inkubiert (siehe 3.1 und 3.5.3). Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.11) und die mRNAs der Prostanoidrezeptoren im Vergleich mit β -Actin durch RT-PCR quantifiziert (siehe 3.12). In unbehandelten primär kultivierten Hepatocyten war die mRNA keiner der G_s -gekoppelten Prostanoidrezeptoren (DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R) nachweisbar (nicht gezeigt). Das Akutphase-Cytokin IL-6 jedoch induzierte die Expression des EP2-R und des EP4-R schnell. Bereits 1 h nach Zugabe von IL-6 konnte die mRNA des EP4-R nachgewiesen werden. Die mRNA-Spiegel stiegen mit der Zeit bis zu einem Maximum nach 20 h an (Abb. 24). Die mRNA des DP-Rezeptors konnte mit ähnlicher Kinetik induziert werden, aber wahrscheinlich in geringerem Ausmaß, da 40 PCR-Cyclen notwendig waren, um die DP-R-mRNA überhaupt zu detektieren. Im Gegensatz dazu konnte die mRNA des IP-R durch IL-6 in Hepatocyten nicht induziert werden (Abb. 24).



Abb. 24: Zeitabhängigkeit der Induktion der mRNAs G_S-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6. Hepatocyten der Ratte wurden durch EDTA-Perfusion isoliert und über einen Percoll-Dichtegradienten gereinigt (siehe 3.1). Sie wurden für 43 h, 42 h, 40 h, 36 h und 24 h vor der Zugabe von 100 ng/ml IL-6 kultiviert. Die Kultur wurde für 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 20 h in Anwesenheit von IL-6 weitergeführt (siehe 3.5.3). Anschließend wurde Gesamt-RNA mittels Affinitäts-Chromatographie isoliert und als Matrize einer oligo(dT)-gestarteten cDNA-Synthese eingesetzt (siehe 3.11 und 3.12). Es wurden 35 PCR-Cyclen mit spezifischen Primerkombinationen für die Prostanoidrezeptoren oder β-Actin mit cDNA-Verdünnungen durchgeführt (siehe 3.12), die sicherstellten, daß die PCR-Reaktion nicht gesättigt ist, ausgenommen für den DP-R, der 40 PCR-Cyclen für eine effiziente Amplifikation benötigte ([DP-R*]). Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Zeitgleich mit den mRNAs konnten die G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren in IL-6vorbehandelten Zellen auch funktionell nachgewiesen werden: Hepatocyten wurden mit IL-6 für 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 20 h vorbehandelt, für 2 min mit PGE₂ oder PGD₂ in Rezeptorsättigenden Konzentrationen von 10 μ M stimuliert und intrazellulär gebildetes cAMP im RIA bestimmt (siehe 3.5.3 und 3.6).

In unbehandelten primär kultivierten Hepatocyten konnte weder PGE_2 noch PGD_2 eine cAMP-Bildung auslösen. Mit dem Erscheinen der mRNAs des EP4-R und des EP2-R 1 h nach Zugabe von IL-6 jedoch begannen die Hepatocyten als Reaktion auf eine PGE_2 -Stimulation mit einer Bildung von intrazellulärem cAMP zu antworten (Abb. 25). So wie die mRNA-Spiegel beider G_8 -gekoppelten Rezeptoren mit der Zeit anstiegen (Abb. 24), verstärkte sich auch die Antwort auf dieselben Konzentrationen an PGE_2 in IL-6-behandelten Hepatocyten mit einem Maximum zwischen 8 h und 20 h. Die cAMP-Bildung konnte auch

durch PGD₂ ausgelöst werden (Abb. 25), aber in Übereinstimmung mit den offensichtlich niedrigeren mRNA-Spiegeln (Abb. 24), fiel auch die PGD₂-vermittelte cAMP-Antwort nicht so stark aus wie die nach PGE₂.



Abb. 25: Funktioneller Nachweis des Zeitverlaufs der Induktion G_S-gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6. Hepatocyten der Ratte wurden wie unter Abb. 24 beschrieben isoliert (siehe 3.1) und für 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 20 h mit 100 ng/ml IL-6 inkubiert. Die Kulturen wurden dann für 2 min mit 10 μ M PGE₂ oder PGD₂ stimuliert, der Überstand entfernt und die Zellen sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren (siehe 3.5.3). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten aus den Differenzen zwischen dem jeweiligen Wert und der Kontrolle (= unstimulierte Hepatocyten).

4.3.2 Dosiswirkung der IL-6-induzierten Expression G_S-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte

Zur Untersuchung der Dosiswirkung der IL-6-induzierten Expression G_S-gekoppelter Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten der Ratte wurden Hepatocyten unter Serum-freien Bedingungen für 8 h mit 1,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml IL-6 stimuliert (siehe 3.5.3). Für die Bestimmung der mRNA-Spiegel wurde anschließend Gesamt-RNA isoliert und die mRNAs der Prostanoidrezeptoren im Vergleich mit β -Actin durch RT-PCR quantifiziert (siehe 3.11 und 3.12) (Abb. 26). Für den funktionellen Nachweis der Rezeptoren wurden die kultivierten Hepatocyten für 2 min mit PGE_2 oder PGD_2 in Rezeptor-sättigenden Konzentrationen von 10 μ M stimuliert und intrazellulär gebildetes cAMP im RIA bestimmt (siehe 3.6) (Abb. 27).



Abb. 26: Dosiswirkung der Induktion der mRNAs G_S-gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6. Hepatocyten der Ratte wurden wie unter Abb. 24 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.1). Nach 36 h wurde IL-6 für 8 h in den Konzentrationen 1,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml Anschließend wurde zugegeben (siehe 3.5.3). Gesamt-RNA mittels Affinitäts-Chromatographie isoliert und als Matrize einer oligo(dT)-gestarteten cDNA-Synthese eingesetzt (siehe 3.11 und 3.12). Es wurden 35 PCR-Cyclen mit spezifischen Primerkombinationen für die Prostaglandinrezeptoren oder β-Actin mit cDNA-Verdünnungen durchgeführt (siehe 3.12), die sicherstellten, daß die PCR-Reaktion nicht gesättigt ist, ausgenommen für den DP-R, der 40 PCR-Cyclen für eine effiziente Amplifikation benötigte ([DP-R*]). Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die Induktion der G_s -gekoppelten Prostaglandinrezeptoren durch IL-6 war dosisabhängig (Abb. 26). IL-6-Konzentrationen von 25 ng/ml induzierten den EP2-R und den EP4-R innerhalb von 8 h deutlich und als Konsequenz daraus wurden so behandelte Hepatocyten sensitiv gegenüber einer PGE₂-vermittelten cAMP-Bildung (Abb. 27). Die Induktion der mRNA des DP-R durch IL-6 (Abb. 26) und die Sensitivität gegenüber einer PGD₂-stimulierten cAMP-Bildung folgte einer ähnlichen Dosiswirkung (Abb. 27). Die maximale Induktion der DP-R-mRNA oder die Induktion der DP-R-Funktion gemessen als PGD₂-ausgelöster cAMP-Anstieg war jedoch weit weniger stark ausgeprägt als die der G_s-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren.



Abb. 27: Funktioneller Nachweis der dosisabhängigen Induktion G_S -gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte durch IL-6. Hepatocyten der Ratte wurden wie unter Abb. 24 beschrieben isoliert und kultiviert (siehe 3.1). Nach 36 h wurde IL-6 für 8 h in den Konzentrationen 1,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml zugegeben. Die Kulturen wurden dann für 2 min mit 10 μ M PGE₂ oder PGD₂ stimuliert, der Überstand entfernt und die Zellen sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren (siehe 3.5.3). Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten aus den Differenzen zwischen dem jeweiligen Wert und der Kontrolle (= unstimulierte Hepatocyten).

4.3.3 Verstärkung der PGE₂-vermittelten cAMP-Bildung in IL-6-behandelten kultivierten Hepatocyten durch Pertussistoxin

Unter normalen Bedingungen exprimieren Hepatocyten den G_i-gekoppelten EP3-R, durch den PGE₂ die Hormon-stimulierte cAMP-Bildung in Hepatocyten vermindert (Brass und Garrity 1990; Okumura *et al.* 1988; Bronstad und Christofferson 1981). Es scheint nicht sinnvoll für eine Zelle zu sein, zwei Rezeptor-Subtypen für denselben Liganden zu exprimieren, die funktionell an gegensätzliche Signalketten gekoppelt sind.

Aus diesem Grund wurde vermutet, daß die mRNA-Spiegel des G_j-gekoppelten EP3-R durch IL-6 parallel zur Induktion der G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R vermindert werden könnten. Die mRNA-Spiegel des EP3-R veränderten sich jedoch durch eine 8 h-Behandlung der kultivierten Hepatocyten mit IL-6 nicht (nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob der EP3-R funktionell in IL-6-behandelten Hepatocyten aktiv ist, wurde

seine intrazelluläre Signalkette durch gleichlange Gabe von Pertussistoxin unterbrochen. Obwohl – auch nach Pertussistoxin-Vorbehandlung (nicht gezeigt) – die mRNA keines der G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren in kultivierten Hepatocyten ohne Inkubation mit IL-6 nachweisbar war, konnte PGE₂ in Pertussistoxin-vorbehandelten, aber nicht mit IL-6-behandelten Hepatocyten, die Bildung von cAMP auslösen (Abb. 28). Das zeigt, daß funktionell wirksame G_S-gekoppelte PGE₂-Rezeptoren auf Hepatocyten im Grundzustand existieren, die jedoch nicht nachweisbar sind, da ihre Wirkung vom vorhandenen EP3-R maskiert wird. Dieser EP3-R ist in IL-6-behandelten Hepatocyten funktionell aktiv, da die PGE₂-vermittelte cAMP-Bildung in diesen Zellen weiter durch Vorbehandlung der Hepatocyten mit Pertussistoxin verstärkt werden konnte (Abb. 28).



Abb. 28: Verstärkung der PGE₂-vermittelten cAMP-Bildung in IL-6-behandelten kultivierten Hepatocyten der Ratte durch Pertussistoxin (PTX). Hepatocyten der Ratte wurden isoliert, gereinigt und kultiviert wie unter Abb. 24 beschrieben (siehe 3.1). Nach 36 h wurden 100 ng/ml IL-6 zu den Kulturen gegeben und die Kultur für 8 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 ng/ml Pertussistoxin weitergeführt (siehe 3.5.3). Hepatocyten wurden dann mit 10 μ M PGE₂ für 2 min stimuliert, der Überstand entfernt und die Zellen sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Bildung von cAMP wurde in den Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten (100% = ohne IL-6 und PTX kultivierte Hepatocyten); ns = nicht signifikant, *p < 0,05, Students *t*-test für ungepaarte Proben.

4.3.4 Induktion G_s-gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in Hepatocyten der Ratte in vivo

Es wurden Hepatocyten aus Ratten isoliert, die 8 h vor der Hepatocyten-Präparation intraperitoneal mit 0,02 μ g IL-6/g Körpergewicht behandelt worden waren oder aus Kontrollratten. Diese Hepatocyten wurden freundlicherweise von Milena Koleva (Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Abteilung Prof. Dr. K. Jungermann, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Direkt nach der Isolation wurden Hepatocyten in Suspension mit 10 μ M PGE₂ oder PGD₂ stimuliert (siehe 3.5.3). In Hepatocyten unbehandelter Ratten kam es nach der Stimulation mit PGE₂ oder PGD₂ zu keinem cAMP-Anstieg. Im Gegensatz dazu war die cAMP-Bildung in Hepatocyten IL-6-behandelter Ratten nach PGE₂-Stimulation deutlich, nach PGD₂-Stimulation weniger stark induziert (Abb. 29).



Abb. 29: **Funktioneller Nachweis** für die Induktion G_S-gekoppelter Prostaglandinrezeptoren in Hepatocyten der Ratte in vivo. Hepatocyten wurden isoliert und gereinigt wie in Abb. 24 beschrieben aus Kontrollratten und aus Ratten, die 8 h vor der Zellpräparation intraperitoneal mit 0,02 µg IL-6/g Körpergewicht behandelt worden waren (siehe 3.1). Hepatocytensuspensionen wurden direkt nach der Präparation 2 min mit 10 µM PGE2 oder PGD2 stimuliert (siehe 3.5.3). Die Reaktion wurde durch Überführung der Zellsuspensionen in flüssigen Stickstoff beendet und cAMP in Zellysaten mittels eines spezifischen RIA's bestimmt (siehe 3.6). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten (100% = unstimulierte Hepatocyten aus Kontrollratten); *p < 0,05, Students *t*-test für ungepaarte Proben.

4.4 Hemmung der IL-6-stimulierten Expression und Sekretion des Akutphase-Proteins α_2 -Makroglobulin durch PGE₂ über eine Beeinträchtigung der α_2 -Makroglobulin-Promotoraktivität in kultivierten Hepatocyten der Ratte

IL-6 ist das Hauptakutphase-Cytokin. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die IL-6abhängig in Hepatocyten exprimierten G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren an der Modulation der Akutphase-Antwort beteiligt sein könnten. Daher wurde der Einfluß von PGE₂ auf die Akutphase-Reaktion untersucht. Das hauptsächliche positive Akutphase-Protein in der Ratte ist α_2 -Makroglobulin (Moshage 1997). Daher wurden Hepatocyten mit IL-6 ± PGE₂ stimuliert und die Spiegel der α_2 -Makroglobulin-mRNA durch RT-PCR und des α_2 -Makroglobulin-Proteins im Westernblot bestimmt.

IL-6 führt nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor zur Dimerisierung zweier gp130-Rezeptoren, wodurch es zur Aktivierung der gp130-assoziierten Janus-Kinasen 1 (Jak1) kommt. Diese phosphorylieren den Tyrosinrest 705 in STAT3-Molekülen, sodaß diese phosphorylierten STAT3-Proteine über ihre SH2-Domänen dimerisieren können, in den Zellkern transloziert werden, um dort an IL-6-responsive DNA-Sequenzen in Promotorregionen verschiedener Gene, z. B. dem α_2 -Makroglobulin-Gen zu binden und die Transkription dieser Gene zu aktivieren. Ob PGE₂ einen inhibitorischen Einfluß auf diese transkriptionelle Aktivierung des α_2 -Makroglobulin-Gens durch IL-6 hat, sollte mit Hilfe des Promotorkonstruktes pGL3- α_2 MG1500 untersucht werden.

4.4.1 Inhibition der IL-6-stimulierten α_2 -Makroglobulin-mRNA-Expression und α_2 -Makroglobulin-Sekretion durch PGE₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte

36 h kultivierte Hepatocyten der Ratte (siehe 3.1) wurden für 8 h mit 100 ng/ml IL-6, 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂, 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂ + 10 μ M Rp-cAMPS sowie 100 ng/ml IL-6 + 1 μ M Forskolin stimuliert (siehe 3.5.4), Gesamt-RNA isoliert und die mRNA von α_2 -Makroglobulin im Vergleich mit β -Actin durch RT-PCR quantifiziert (siehe 3.11 und 3.12). Die mRNA des α_2 -Makroglobulin wurde in kultivierten Hepatocyten durch IL-6 innerhalb von 8 h beinahe maximal induziert (Abb. 30). Wenn PGE₂ während dieser Inkubationsperiode zu den Hepatocyten gegeben wurde, konnte der IL-6-induzierte Anstieg der α_2 -MakroglobulinmRNA um fast 50% vermindert werden. Diese PGE₂-vermittelte Inhibition konnte nachgeahmt werden, wenn die cAMP-Bildung unspezifisch durch Zugabe des Adenylatcyclase-Aktivators Forskolin ausgelöst wurde (Abb. 30). Auf der anderen Seite wurde die PGE₂-vermittelte Inhibition der IL-6-stimulierten α_2 -Makroglobulin-mRNA-Bildung unterdrückt, wenn der cAMP-Antagonist Rp-cAMPS zusammen mit PGE₂ zu den Hepatocyten gegeben wurde (Abb. 30). Somit vermittelt PGE₂ seinen inhibitorischen Effekt auf die Synthese der mRNA des α_2 -Makroglobulin durch einen Anstieg von intrazellulärem

cAMP über einen durch IL-6 induzierten G_s -gekoppelten PGE_2 -Rezeptor und nicht über den G_i -gekoppelten EP3-R oder den G_q -gekoppelten EP1-R, die beide ebenfalls auf Hepatocyten zu finden sind (Tab. 2).



Abb. 30: Inhibition der IL-6-induzierten Expression der α_2 -Makroglobulin-mRNA durch PGE2 über G_S-gekoppelte PGE2-Rezeptoren in kultivierten Hepatocyten der Ratte. Hepatocyten der Ratte wurden isoliert und gereinigt wie in Abb. 24 beschrieben (siehe 3.1). Nach 36 h wurden 100 ng/ml IL-6, 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE2, 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE2 + 10 μ M Rp-cAMPS sowie 100 ng/ml IL-6 + 1 μ M Forskolin zu den Hepatocyten gegeben und die Kultur für weitere 8 h fortgeführt (siehe 3.5.4). Anschließend wurde Gesamt-RNA mittels Affinitäts-Chromatographie isoliert und als Matrize einer oligo(dT)-gestarteten cDNA-Synthese eingesetzt (siehe 3.11). Es wurden 35 PCR-Cyclen mit spezifischen Primerkombinationen für α_2 -Makroglobulin oder β -Actin mit cDNA-Verdünnungen durchgeführt (siehe 3.12), die sicherstellten, daß die PCR-Reaktion nicht gesättigt ist. Eine repräsentative PCR von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die spezifischen Banden wurden mit dem Software-Programm Quantity One der Firma BioRad quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten; *p < 0,05, Students *t*-test für ungepaarte Proben. Für die Untersuchung des Einflusses von PGE₂ auf die Synthese und die Sekretion des α_2 -Makroglobulin-Proteins wurden 36 h kultivierte Hepatocyten für 8 h mit 100 ng/ml IL-6 ± 10 μ M PGE₂ inkubiert und anschließend der Zellkulturüberstand abgenommen (siehe 3.5.4). Gleiche Mengen an Gesamt-Protein wurden im Westernblot mit Hilfe eines polyklonalen Antikörper gegen humanes α_2 -Makroglobulin analysiert (siehe 3.10).

Unstimulierte Hepatocyten synthetisierten bereits im Westernblot nachweisbare Mengen an α_2 -Makroglobulin (Abb. 31). Die α_2 -Makroglobulin-Synthese wurde durch Behandlung der Hepatocyten mit IL-6 deutlich auf das etwa 3-fache gesteigert (Abb. 31). Die IL-6-abhängige Steigerung der α_2 -Makroglobulin-Synthese wurde durch die gleichzeitige Gabe von PGE₂ um ca. 50% gehemmt (Abb. 31). Damit korrelierten die Veränderungen der Proteinsynthese gut mit denen der mRNA-Spiegel (Abb. 30).



Abb. 31: Inhibition der IL-6-induzierten Sekretion des α_2 -Makroglobulin-Proteins durch PGE₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte. Hepatocyten der Ratte wurden isoliert und gereinigt wie in Abb. 24 beschrieben (siehe 3.1). Nach 36 h wurden 100 ng/ml IL-6 bzw. 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂ zu den Zellen gegeben und die Kultur für weitere 8 h fortgeführt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und gleiche Gesamt-Proteinmengen im Westernblot mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen humanes α_2 -Makroglobulin, einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und dem ECL-System analysiert (siehe 3.5.4 und 3.10). Ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die spezifischen Banden wurden mit dem Software-Programm Quantity One der Firma BioRad quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten; *p < 0,05, Students *t*-test für ungepaarte Proben.

4.4.2 Hemmung der IL-6-stimulierten transkriptionellen Aktivität des α_2 -Makroglobulin-Promotors durch PGE₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte

Hepatocyten wurden isoliert und gereinigt (siehe 3.1) und direkt nach dem Ausplattieren nach der Calciumphosphat-Methode mit dem α_2 -Makroglobulin-Promotorkonstrukt pGL3- α 2MG1500 zusammen mit dem Plasmid pRc/CMV-STAT3 transfiziert (siehe 3.21). Nach 36 h wurden die so transfizierten Hepatocyten für 8 h mit IL-6 ± PGE₂ inkubiert und anschließend wie unter 3.22.3 beschrieben aufgearbeitet. Aliqouts der Zellysate wurden in den Luciferase-Assay eingesetzt (siehe 3.22).

Unstimulierte transfizierte Hepatocyten zeigten eine nur sehr geringe Luciferase-Aktivität (Abb. 32). Durch die Inkubation mit IL-6 jedoch kam es zu einer starken Zunahme der Aktivität des Luciferase-Enzym, während die gleichzeitige Gabe von PGE₂ diese IL-6-stimulierte Aktivitätszunahme um ca. 50% reduzierte.



Abb. 32: Inhibition der IL-6-stimulierten transkriptionellen Aktivierung des α_2 -Makroglobulin-Promotors durch PGE₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte. Hepatocyten der Ratte wurden wie in Abb. 24 beschrieben isoliert und gereinigt. 36 h nach der Transfektion mit dem α_2 -Makroglobulin-Promotorkonstrukt pGL3- α_2 MG1500 zusammen mit dem Plasmid pRc/CMV-STAT3 (siehe 3.21) wurden die Zellen für 8 h mit 100 ng/ml IL-6 \pm 10 μ M PGE₂ inkubiert, die Hepatocyten wie unter 3.22 beschrieben aufgearbeitet und 5 μ l der Zellysate in den Luciferase-Assay eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten; *p < 0,05, Students *t*-test für ungepaarte Proben.
4.4.3 Verzögerte Hemmung der IL-6-stimulierten Phosphorylierung von STAT3 aber nicht Jak1 durch PGE₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte

Die Phosphorylierung des STAT3-Transkriptionsfaktors ist ein wichtiger Vorgang in der IL-6-Signalkette. Nach der Phosphorylierung eines spezifischen Tyrosinrestes dimerisieren zwei STAT3-Moleküle und wandern in den Zellkern, um dort an spezifische DNA-Sequenzen zu binden und die Transkription der entsprechenden Gene auszulösen (Abb. 2). Es sollte untersucht werden, ob PGE₂ einen Einfluß auf die IL-6-ausgelöste Phosphorylierung des STAT3-Proteins hat. Dazu wurden 36 h kultivierte Hepatocyten (siehe 3.1) für 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h mit 100 ng/ml IL-6 \pm 10 μ M PGE₂ inkubiert (siehe 3.5.5). Anschließend wurden aus den so behandelten Hepatocyten wie unter 3.5.5 beschrieben Kernfraktionen zum Nachweis des Tyrosin-Phosphorylierungsgrades von STAT3 isoliert oder Zellysate zum Nachweis des Tyrosin-Phosphorylierungsgrades von Jak1 hergestellt und im Westernblot analysiert (siehe 3.10).



Abb. 33: Verzögerte Hemmung der IL-6-stimulierten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch PGE₂ in kultivierten Hepatocyten der Ratte. Hepatocyten der Ratte wurden isoliert und gereinigt wie in Abb. 24 beschrieben. Nach 36 h wurden 100 ng/ml IL-6 bzw. 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE₂ zu den Zellen gegeben und die Kultur für weitere 8 h fortgeführt. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt (siehe 3.5.5) und gleiche Mengen Gesamt-Protein im Westernblot mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen Tyrosin⁷⁰⁵-phosphoryliertes STAT3, einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und dem ECL-System analysiert (siehe 3.10). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten; *p < 0,05, Students *t*-test für ungepaarte Proben.

Durch die Inkubation mit IL-6 war die maximale Phosphorylierung der STAT3-Proteine bereits nach 15 min erreicht (Abb. 33); nach längerer Inkubation mit IL-6 kam es bereits zu einer Abnahme der STAT3-Phosphorylierung, die jedoch nicht vollständing zurückging und auch nach 8 h noch anhielt (Abb. 33). Die gleichzeitige Gabe von PGE₂ hatte zu den frühen Zeitpunkten (15 min bis 1h) keinen Effekt auf die Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 33). Erst nach 2 h machte sich eine Abnahme von ca. 50% der STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zu nur mit IL-6-behandelten Hepatocyten bemerkbar, die auch nach 8 h noch deutlich zu erkennen war (Abb. 33). Dieses Ergebnis zeigte, daß der erst nach 2 h auftretende hemmende Effekt des PGE₂ auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung wahrscheinlich erst über die Induktion der G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R vermittelt werden konnte.



Abb. 34: Fehlender Einfluß von PGE2 auf die IL-6-stimulierte Phosphorylierung der Janus-Kinase Jak1 in kultivierten Hepatocyten der Ratte. Hepatocyten der Ratte wurden isoliert und gereinigt wie in Abb. 24 beschrieben. Nach 36 h wurden 100 ng/ml IL-6 bzw. 100 ng/ml IL-6 + 10 μ M PGE2 zu den Zellen gegeben und die Kultur für weitere 8 h fortgeführt. Anschließend wurden Zellysate hergestellt (siehe 3.5.5.) und gleiche Gesamt-Proteinmengen im Westernblot mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen Tyrosin-phosphoryliertes Jak1, einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und dem ECL-System analysiert (siehe 3.10). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu hatte PGE₂ über den gesamten untersuchten Zeitraum keinen Einfluß auf den IL-6-induzierten Phosphorylierungsgrad der Janus-Kinase Jak1 (Abb. 34), die in der IL-6-Signalkette IL-6-abhängig durch ihre Phosphorylierung aktiviert wird und anschließend STAT3 durch eine Phosphorylierung aktiviert (Abb. 2).

Der Hemmeffekt des PGE_2 auf die Aktivierung des α_2 -Makroglobulin-Gens müßte also in der IL-6-Signalkette zwischen Jak1 und STAT3 lokalisiert sein. Hierzu sind weitere Experimente erforderlich.

5. Diskussion

5.1 Bedeutung konstitutiv exprimierter G_S-gekoppelter Prostanoidrezeptoren auf Nichtparenchymzellen der Rattenleber

In vorangegangenen Studien konnte durch RT-PCR gezeigt werden, daß die mRNAs der G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren (EP2-R, EP4-R und IP-R) differentiell in frisch isolierten, nicht kultivierten Nichtparenchymzellen (Kupfferzellen, sinusoidale Endothelzellen und Perisinusoidalzellen) exprimiert werden, während der G_i-gekoppelte EP3-Rezeptor in allen drei Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Tab. 2 und Fennekohl *et al.* 1999). Auffälig ist auch die parallele Expression der mRNA beider G_S-gekoppelter PGE₂-Rezeptoren (EP2-R und EP4-R) in Kupfferzellen, die starke Expression der mRNA des IP-R in sinusoidalen Endothelzellen und die starke Expression der mRNA des IP-R in Perisinusoidalzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß in 72 h kultivierten Kupfferzellen die beiden G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R ebenfalls parallel exprimiert (Abb. 10 und Tab. 2a) wurden, während die mRNA des G_j-gekoppelten EP3-R nicht nur in kultivierten Kupfferzellen, sondern auch in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen und Perisinusoidalzellen nicht mehr nachzuweisen war (Abb. 10 und Tab. 2a). Die starke Expression des EP4-R in sinusoidalen Endothelzellen und des IP-R in Perisinusoidalzellen änderte sich im Laufe der Kulturdauer nicht (Abb. 10 und Tab. 2a). Die Ergebnisse der funktionellen Analyse stimmen mit diesen auf mRNA-Ebene erhobenen Daten für die G_S-gekoppelten Rezeptoren EP2-R, EP4-R und IP-R auf allen Nichtparenchymzell-Typen überein, für den G_j-gekoppelten EP3-R funktionell auf diesem Zelltyp nachgewiesen werden konnte (Abb. 19), konnte seine mRNA in kultivierten Perisinusoidalzellen nicht mehr detektiert werden (Abb. 10 und Tab. 2a).

5.1.1 Funktionen des EP2-R und EP4-R auf Kupfferzellen der Ratte

Die Expression der beiden G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R änderte sich durch die Kultivierung von Kupfferzellen nicht. Sowohl in frisch isolierten als auch in 72 h kultivierten Kupfferzellen konnten die mRNAs beider Prostanoidrezeptoren nachgewiesen werden (vgl. Tab. 2a und Abb. 10).

Die funktionelle Analyse unterstützte das Vorhandensein von G_s -gekoppelten PGE_2 -Rezeptoren (EP2-R und EP4-R) auf Kupfferzellen, die nach PGE_2 -Stimulus mit einem starken cAMP-Anstieg reagierten (Abb. 11 und Abb. 13). Bei Untersuchungen an kultivierten

Kupfferzellen aus der Ratte und aus der Maus (s. u.) mit den EP2-R- und EP4-Rspezifischen Liganden ONO613 und ONO604 konnte funktionell zwischen den beiden PGE_2 -Rezeptorsubtypen unterschieden werden und beide auch funktionell nachgewiesen werden (Abb. 12). Daher scheinen in Kupfferzellen beide G_8 -gekoppelten PGE_2 -Rezeptoren parallel exprimiert zu sein.

LPS (Lipopolysaccharid), ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, löst in Kupfferzellen die Synthese und Freisetzung des Cytokins TNF α aus (Peters *et al.* 1990). Neben TNFa kommt es in Kupfferzellen aber auch zur LPS-stimulierten Produktion von PGE₂ durch die transkriptionelle Aktivierung des induzierbaren Cyclooxygenase-2-Gens (Dieter et al. 1999). PGE₂ kann autokrin in einer negativen Rückkopplungsschleife über intrazellulären cAMP-Anstieg LPS-induzierte einen die TNF α -Freisetzung auf transkriptioneller Ebene hemmen (Abb. 35) (Dieter et al. 1999, Peters et al. 1990). Dieser antiinflammatorische Effekt könnte also über den EP2-R oder den EP4-R vermittelt werden (Abb. 35), da beide G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren, die nach Stimulation mit PGE₂ einen intrazellulären cAMP-Anstieg auslösen, nachweisbar waren (Abb. 10 und Tab. 2a). In der vorliegenden Arbeit konnten die Rollen des EP2-R und EP4-R in dieser negativen Rückkopplungsschleife mit Hilfe von EP2-R- bzw. EP4-R-defizienten Mäusen genauer aufgeklärt werden (siehe 5.2).

5.1.2 Funktionen des EP4-R auf sinusoidalen Endothelzellen der Ratte

Frisch isolierte sinusoidale Endothelzellen exprimieren die mRNA der G_s -gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP4-R und EP2-R, den G_i -gekoppelten EP3-R und in geringen Mengen auch den G_s -gekoppelten IP-R (Tab. 2 und Fennekohl et al. 1999).

In 72 h kultivierten sinusoidalen Endothelzellen wurde die mRNA des EP4-R und des IP-Rezeptors gefunden, die des EP3-R und des EP2-R dagegen nicht (Abb. 10 und Tab. 2a). Die Expression des EP4-R und die fehlende Expression des EP2-R ergab sich auch aus den funktionellen Studien zum Anstieg von intrazellulärem cAMP nach Stimulation mit PGE₂ bzw. PGE₂-Rezeptorsubtyp-spezifischen Liganden (Abb. 14-16). Das Vorhandensein des IP-R konnte funktionell nicht bestätigt werden (Abb. 14). Der EP3-R konnte auch funktionell nicht bestätigt werden (Abb. 14).

Sinusoidale Endothelzellen gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen (Lohse et al. 1996) und können sowohl naive CD4⁺ T-Lymphocyten als auch Gedächtnis-T-Lymphocyten aktivieren (Knolle *et al.* 1999). In einem T-Zell-Aktivierungsassay konnte die Antigenpräsentation durch sinusoidale Endothelzellen durch PGE₂ reduziert werden (Knolle *et al.* 2000).

In sinusoidalen Endothelzellen der Maus hemmte PGE₁ dosisabhängig die mit LPS oder mit dem Calcium-Ionophor A23187 ausgelöste Produktion von IL-1 und PAF (Mizoguchi *et al.* 1991), wodurch entzündliche Reaktionen in der Leber vermindert werden könnten.

Es ist jedoch nicht klar, ob für diese beiden Effekte der G_S-gekoppelte PGE₂-Rezeptor EP4-R verantwortlich ist oder vielleicht der EP1-R, der ebenfalls auf mRNA-Ebene auf frisch isolierten sinusoidalen Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (Tab. 2). Ob es im Verlauf der Kultur zu einer Verminderung der Expression des EP1-R kommt, wie es bei sinusoidalen Endothelzellen für den EP2-R und EP3-R gezeigt werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

Eine mögliche Funktion des EP4-R auf sinusoidalen Endothelzellen könnte also eine Hemmung der Antigenpräsentation im Laufe der Akutphase-Antwort sein (Abb. 35), wodurch die Induktion einer Immunantwort durch die Aktivierung von T-Lymphocyten gehemmt werden könnte.

Das Vorhandensein des IP-R konnte funktionell nicht bestätigt werden (Abb. 14). Es ist unwahrscheinlich, daß das IP-R-Protein nicht von den sinusoidalen Endothelzellen gebildet wird, obwohl seine mRNA vorhanden ist. Aus diesem Grund muß man vermuten, daß unter den gegebenen Umständen das Protein des IP-R funktionell keine Bedeutung in diesem Zelltyp hat. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, daß der G_S-gekoppelte IP-R in einem Zellkompartiment lokalisiert ist, das für den Liganden Iloprost nicht zugänglich ist. Von Böer et al. (2000) konnte gezeigt werden, daß der EP3-R nach Überexpression zu großen Teilen in der perinucleären Zone des endoplasmatischen Retikulums zurückgehalten wurde. In cerebralen Endothelzellen des Schweins konnte der dort natürlicherweise exprimierte EP3-R vorwiegend in diesem Zellkompartiment gefunden werden (Bhattacharya et al. 1999). Für den IP-R wurde eine perinucleäre Lokalisation jedoch noch nicht beschrieben.

5.1.3 Funktionen des IP-R auf Perisinusoidalzellen der Ratte

Frisch isolierte Perisinusoidalzellen exprimierten nur geringe Mengen der mRNA der G_s -gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R, aber große Mengen der mRNA des G_s -gekoppelten IP-R (Tab. 2 und Fennekohl *et al.* 1999).

In 48 h kultivierten Perisinusoidalzellen war nur noch die mRNA des G_s -gekoppelten PGE₂-Rezeptors vom EP2-R-Subtyp sowie in großen Mengen die des G_s -gekoppelten IP-R nachweisbar (Abb. 10 und Tab. 2a). Die schwache Expression des EP2-R und die starke Expression des IP-R konnte funktionell durch einen intrazellulären cAMP-Anstieg nach Stimulation mit PGE₂-Rezeptorsubtyp-spezifischen Agonisten (Abb. 18) bzw. mit dem IP-Rspezifischen Agonisten Iloprost (Abb. 17) nachgewiesen werden.

Endothelin kann über seine intrazellulären sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat und Ca^{2+} zu einer Kontraktion von Perisinusoidalzellen führen (Kawada *et al.* 1996). Über den

IP-R könnte Prostacyclin diese Kontraktion durch einen intrazellulären cAMP-Anstieg antagonisieren (Abb. 35). Der Antagonismus konnte für kontrahierte Perisinusoidalzellen in Kultur gezeigt werden, die nach Zugabe von Iloprost, einem Prostacyclin-Analog, relaxierten (Kawada *et al.* 1992).



Abb. 35: Mögliche Funktionen der funktionell und auf mRNA-Ebene nachgewiesenen G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren auf Nichtparenchymzellen der Rattenleber. PGE₂ kann über die beiden G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R die LPSstimulierte Freisetzung des proinflammatorischen Cytokins TNF α in Kupfferzellen (KC) inhibieren. Über einen bisher nicht-identifizierten PGE₂-Rezeptor wird in sinusoidalen Endothelzellen (SEC) durch PGE₂ die Antigenpräsentation vermindert. Durch Endothelinbehandelte kontrahierte Perisinusoidalzellen (PSC) relaxieren nach Zugabe von Iloprost, einem Prostacyclin-Analog. ET-R, Endothelin-Rezeptor; LPS, Lipopolysaccharid; LPS-R, LPS-Rezeptor; Tumor Necrose Faktor α , TNF α . Ein direkter Vergleich der mRNA-Spiegel des EP2-R und EP4-R durch RT-PCR (Abb. 20) zeigte, daß Kupfferzellen der Maus die mRNAs beider G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren in ähnlichen Mengen exprimieren. Im Gegensatz zu Untersuchungen in Makrophagen-Zellinien (Katsuyama *et al.* 1998) wurde die mRNA des EP2-R durch LPS nicht induziert (nicht gezeigt).

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß sich die beiden G_s -gekoppelten PGE_2 -Rezeptoren EP2-R und EP4-R gegenseitig bei der Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung ersetzen können (Abb. 21). Dieses Ergebnis stimmt mit den in gingivalen Fibroblasten gefundenen Ergebnissen überein (Noguchi *et al.* 1999).

Die vorliegenden Ergebnisse favorisieren den EP4-R als physiologisch relevanteren in dieser negativen Rückkopplungsschleife.

Inkubation von Kupfferzellen mit LPS führte zu einer endogenen Synthese und Freisetzung von PGE₂ in Kupfferzellen. Die PGE₂-Konzentrationen in den Überständen LPS-stimulierter Kupfferzellen lagen bei ca. 5 nM (Tab. 7) und waren damit nicht Rezeptor-sättigend. Diese gefundene PGE₂-Konzentration liegt im Bereich der EC50 des EP4-R (ca. 10 nM, Abb. 22 und Tab. 8), liegt jedoch ca. 20-fach unter der EC50 des EP2-R (ca. 100 nM, Abb. 22 und Tab. 8). Der EP4-R sollte daher der zunächst wichtigere Rezeptor in der negativen Rückkopplungsschleife sein. In Übereinstimmung mit der offenbar herausragenden Rolle des EP4-R in der PGE₂-vermittelten Inhibition der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung waren die niedrigen endogenen PGE₂-Konzentrationen in EP4-R-defizienten Kupfferzellen weniger wirkungsvoll bei der Inhibition der TNF α -Freisetzung als in EP2-R-defizienten und führten zu einem Anstieg der LPS-induzierten TNF α -Bildung im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 21).

Diese mit PGE₂-Rezeptor-defizienten Kupfferzellen erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, daß beide G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren, der EP2-R und der EP4-R die PGE₂-abhängige Inhibition der LPS-induzierten TNF α -Bildung vermitteln können (Abb. 35).

Es scheint jedoch so zu sein, daß der EP4-R bei der Inhibition durch niedrige endogene PGE₂-Konzentrationen eine wichtigere Rolle spielt als der EP2-R. Der EP4-R könnte demnach als hochaffiner PGE₂-Rezeptor wirken, während der EP2-R mit seiner niedrigeren PGE₂-Affinität erst bei ausreichend hohen PGE₂-Konzentrationen wirksam wird. Aber trotzdem werden – auch bei niedrigen endogen produzierten PGE₂-Konzentrationen – beide Rezeptoren für eine maximale Hemmung der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung benötigt: sowohl bei EP2-R-defizienten Kupfferzellen als auch bei EP4-R-defizienten Kupfferzellen sanken die TNF α -Spiegel auch zu späten Zeitpunkten nach der LPS-Stimulation nicht auf die basalen Spiegel (Abb. 23).

Es scheint nicht sinnvoll für eine Zelle zu sein, zwei Rezeptoren für denselben Liganden zu exprimieren, die beide an dieselbe intrazelluläre Signalkette koppeln. Eine mögliche

Erklärung hierfür könnte sein, daß die beiden Rezeptoren verschieden empfänglich sind gegenüber einer Agonisten-induzierten Desensitierung (Kiriyama et al. 1997, Nishigaki et al. 1996). Der EP4-R zeigt eine schnelle Agonisten-induzierte Desensitierung, der EP2-R jedoch nicht. Somit müßte der EP4-R zu frühen Zeitpunkten nach PGE₂-Zugabe aktiv sein, während der EP2-R auch zu späteren Zeitpunkten noch wirksam ist, wenn der EP4-R bereits durch seine Desensitierung inaktiviert ist.

Die vorliegende Arbeit unterstützt diese Hypothese nicht (Abb. 23). Sowohl EP2-R-defiziente Kupfferzellen als auch EP4-R-defiziente Kupfferzellen waren gegenüber exogen zugegebenem PGE₂ über eine gesamten untersuchten Zeitraum von 48 h sensitiv. In EP2-R-defizienten Kupfferzellen konnte keine Desensitierung des EP4-R festgestellt werden. Endogenes PGE₂ scheint in EP4-R-defizienten Kupfferzellen zu allen Zeitpunkten weniger wirksam bei der Hemmung der LPS-stimulierten TNF α -Freisetzung zu sein. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der EP4-R auch nach langer Exposition mit endogenem PGE₂ wirksamer ist als der EP2-R.

Die beiden PGE₂-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität für PGE₂ könnten einen doppelten Schutz darstellen. Dies könnte die unterschiedliche Regulation ihrer Gene unter verschiedenen Bedingungen zeigen. Residente Peritonealmakrophagen exprimieren ohne jegliche Stimulation nur den EP4-R. Werden sie mit LPS stimuliert, ist der EP4-R nicht mehr nachweisbar (Sugimoto et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Der EP2-R könnte dann einen zusätzlichen Schutz darstellen, wenn die Expression des EP4-R durch verschiedene Kombinationen inflammatorischer Stimuli beeinflußt und beeinträchtigt ist.

5.3 Bedeutung der induzierbaren G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren in Hepatocyten der Rattenleber

5.3.1 Bedeutung der Induktion G_s-gekoppelter PGE₂-Rezeptoren durch IL-6 in Hepatocyten der Ratte

Unbehandelte primär kultivierte Hepatocyten sowie frisch isolierte Hepatocyten exprimieren keine der mRNAs G_s -gekoppelter Prostanoidrezeptoren (DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R) (Abb. 24, Tab. 2 und Fennekohl *et al.* 1999). Durch die Stimulation mit einem Schlüssel-Cytokin der Akutphase-Antwort, dem IL-6, kam es in Hepatocyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* jedoch zu einer schnellen und effizienten Induktion der G_s -gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R (Abb. 24 und Abb. 29).

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob es in Hepatocyten als Antwort auf eine Stimulation mit PGE_2 zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg kommt oder nicht. Einige Arbeitsgruppen berichten einen PGE_2 -ausgelösten Anstieg in cAMP in Hepatocyten (Melien *et al.* 1988; Wincek *et al.* 1975), während in anderen Untersuchungen PGE_2 einen solchen Anstieg nicht bewirkte (Refsnes *et al.* 1995; Püschel *et al.* 1993). Auch in der vorliegenden Arbeit führte PGE_2 in unvorbehandelten primär kultivierten Hepatocyten der Ratte nicht zu einer cAMP-Erhöhung (Abb. 28).

Das Fehlen einer PGE_2 -abhängigen cAMP-Steigerung in primär kultivierten unbehandelten Hepatocyten ist im Einklang mit dem auf mRNA-Ebene gefundenen Ergebnis: Erst die IL-6behandelten Hepatocyten wurden sensitiv gegenüber PGE_2 und reagierten über die induzierten G_S-gekoppelten EP2-R und EP4-R mit einem cAMP-Anstieg (Abb. 25 und Abb. 29).

Mit diesem Befund liefert die vorliegende Arbeit eine mögliche Erklärung für die offensichtiche Diskrepanz zwischen den oben genannten Studien. Von Arola *et al.* (1980) und Deak *et al.* (1997) wurde gezeigt, daß selbst geringster Streß einen Einfluß auf die Akutphase-Antwort haben kann. Somit könnten die Unterschiede in der Reaktion auf PGE₂ unterschiedlich ausgeprägten Behandlungstress der Versuchstiere vor und während der Hepatocytenisolierung widerspiegeln. Warum kommt es in Streßsituationen oder genauer, wie in dieser Arbeit gezeigt, nach IL-6-Stimulation zur *de novo*-Expression der G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R? Bei vielen Prozessen, so auch bei Streßsituationen oder hier bei der IL-6-stimulierten Synthese von Akutphase-Proteinen, kann es zu einer überschießenden Aktivität kommen. Diese sollte der Organismus nach oben limitieren. Die Induktion des EP2-R und EP4-R durch IL-6 in Hepatocyten dient dieser Aufgabe. Das bei einer Entzündung mehr gebildete PGE₂ kann die IL-6-ausgelöste Synthese von Akutphase-Proteinen in Hepatocyten über die induzierbaren EP2-R und EP4-R hemmen (Abb. 36).

Überraschenderweise konnte PGE_2 in Pertussistoxin-behandelten Hepatocyten eine cAMP-Antwort auslösen, obwohl keine der mRNAs einer der G_s -gekoppelten PGE_2 -Rezeptoren nachweisbar war (Abb. 28). Pertussistoxin selber induzierte die Expression der mRNA der Rezeptoren nicht (nicht gezeigt). Der PGE_2 -vermittelte cAMP-Anstieg nach Pertussistoxin-Vorbehandlung könnte das Vorhandensein einer geringen Anzahl G_s -gekoppelter PGE_2 -Rezeptoren unter normalen Bedingungen widerspiegeln. Die von dieser geringen Anzahl stammenden cAMP-Signale könnten normalerweise durch die dominierende Wirkung des G_i gekoppelten EP3-Rezeptors maskiert sein, der von Hepatocyten konstitutiv exprimiert wird (Tab. 2 und Fennekohl *et al.* 1999). Alternativ könnte der PGE_2 -vermittelte cAMP-Anstieg in der Gegenwart von Pertussistoxin auch daher rühren, daß der EP3-R nicht ausschließlich an G_i -Proteine, sondern unter Bedingungen, unter denen die G_i -Kopplung unterdrückt ist, auch an G_s -Proteine koppelt. Dies wurde bislang aber nur für eine C-terminale Spleißvariante des EP3-Rezeptors der Maus beschrieben und wurde für den EP3-R der Ratte noch nicht gezeigt (Irie *et al.* 1993).

5.3.2 Bedeutung der Induktion des G_S-gekoppelten PGD₂-Rezeptors durch IL-6 in Hepatocyten der Ratte

Normale frisch isolierte Hepatocyten oder bis zu 20 h kultivierte Hepatocyten enthielten keine mRNA des DP-R (Tab. 2, Abb. 24 und Abb. 26). IL-6 induzierte die mRNA des DP-R in kultivierten Hepatocyten nur schwach (Abb. 24). Das Fehlen des DP-R in Hepatocyten mag überraschen.

Es wurde wiederholt berichtet, daß PGD₂ das hauptsächlich von der Leber gebildete Prostanoid sei (Püschel *et al.* 1993; vom Dahl *et al.* 1990; Kuiper *et al.* 1988; Casteleijn *et al.* 1988a; Tran-Thi *et al.* 1988a und 1988b). Mit Ausnahme einer einzigen Veröffentlichung (Casteleijn *et al.* 1988a) wurde jedoch gefunden, daß PGD₂ weniger wirkungsvoll bei der Stimulation der Glykogenphosphorylase-Aktivität in Hepatocyten (Püschel *et al.* 1996), der Glucose-Freisetzung aus der perfundierten Leber (Iwai *et al.* 1988) oder ohne signifikanten Effekt auch auf die Funktion von Nichtparenchymzellen war (Hoffmann *et al.* 1994; Tzung *et al.* 1990). Die Induktion der mRNA des DP-R in Hepatocyten durch IL-6 (Abb. 24 und Abb. 26) könnte bedeuten, daß die Leber im Grundzustand nicht auf PGD₂ reagiert, aber während der Akutphase-Antwort sensitiv gegenüber diesem hauptsächlich von Nichtparenchymzellen synthetisierten Prostaglandins wird. Dagegen spricht, daß, obwohl die mRNA des DP-R durch IL-6 in Hepatocyten in gewissem Ausmaß induziert werden konnte, der durch PGD₂ ausgelöste intrazelluläre cAMP-Anstieg in IL-6-behandelten Hepatocyten oder in Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten im Vergleich zu PGE₂ sehr gering war (Abb. 25 und Abb. 29).

5.3.3 Die Rolle von PGE₂ während der akuten und subakuten Phase der Entzündung in der Leber

Prostanoide greifen modulierend in die Regulation der Entzündungsantwort der Leber ein. Dabei scheint es durch eine Änderung der Prostanoidrezeptor-Expression im Laufe der Entzündungsreaktion zu einer Umstellung der Antwort der Hepatocyten auf PGE₂ zu kommen.

Während der Akutphase-Antwort erfordert die verstärkte Synthese von positiven Akutphase-Proteinen in der Leber einen erhöhten Bedarf an Aminosäuren und Nucleotiden. Während der Aminosäure-Bedarf der Leber durch einen Cytokin-stimulierten Anstieg der Proteolyse im Muskel und den damit verbundenen Aminosäure-Transport zur Leber gedeckt werden kann (Memon et al. 1994; Klasing 1988; Filkins 1985), muß der Bedarf an Nucleotiden durch die Leber selber bereitgestellt werden. Dies wird einerseits durch eine reduzierte Expression der negativen Akutphase-Proteine erreicht, andererseits aber auch durch eine reduzierte Expression von metabolischen Enzymen. In nicht-vorbehandelten primär kultivierten Hepatocyten inhibiert das Cytokin IL-6 über seine Signalkaskade und PGE2 über den Gigekoppelten EP3-Rezeptor die Glucagon-stimulierte Induktion des Schlüsselenzyms der Gluconeogenese, der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Püschel und Christ 1994). Diese Inhibition der Glucagon-induzierten Transkription des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Gens durch PGE₂ oder auch IL-6 könnte eine Strategie des Hepatocyten sein, die Resourcen für die Akutphase-Antwort in der akuten Phase der Entzündung bereitzustellen (Christ et al. 1994). In IL-6-behandelten kultivierten Hepatocyten werden die G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R und der Gi-gekoppelte PGE₂-Rezeptor EP3-R exprimiert (Abb. 24 und Abb. 28). In der subakuten Phase der Entzündung könnte die Hemmung der Glucagon-abhängigen Induktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase durch PGE₂ über den EP3-R aufgehoben werden, da die PGE₂-Wirkungen über den EP3-R einerseits und den EP2-R und EP4-R andererseits sich vielleicht kompensieren. Dieses müßte jedoch genauer untersucht werden.

 PGE_2 kann in nicht-vorbehandelten primär kultivierten Hepatocyten über einen bisher nicht-identifizierten Rezeptor die Bildung von α_2 -Makroglobulin steigern (Anbalagan und Sadique 1984). In der akuten Phase der Entzündung verstärkt PGE_2 also offensichtlich die Akutphase-Reaktion. Im Gegensatz dazu scheint die in dieser Arbeit gezeigte IL-6-induzierte Expression der G_S-gekoppelten PGE_2 -Rezeptoren EP2-R und EP4-R eine negative Rückkopplungsschleife zu etablieren, durch die PGE_2 die IL6-vermittelte Induktion des Akutphase-Proteins α_2 -Makroglobulin über eine cAMP-abhängige intrazelluläre Signalkette während der subakuten Phase der Entzündung beschränken kann (Abb. 30 und Abb. 31).

5.3.4 Mechanismus der PGE₂-abhängigen Hemmung der IL-6-induzierten α_2 -Makroglobulin-Synthese

PGE₂ scheint seinen inhibitorischen Effekt auf die IL-6-induzierte α_2 -Makroglobulin-Synthese über eine Verminderung des Spiegels an Tyrosin-phosphoryliertem STAT3 auszuüben (Abb. 33). Der Phosphorylierungsgrad des in der IL-6-Signalkette vorgeschalteten Jak1-Proteins und damit die katalytische Aktivität der Janus-Kinase scheint nämlich von PGE₂ nicht beeinflußt zu werden (Abb. 34). Außerdem konnte von Kolenko *et al.* (1999) gezeigt werden, daß PGE₂ cAMP-abhängig in IL-2-stimulierten T-Lymphocyten keinen Einfluß auf die Proteinspiegel von Jak1 hat.

Die PGE₂-vermittelte Verminderung der IL-6-ausgelösten STAT3-Phosphorylierung kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte PGE2 einen positiven Effekt auf den proteolytischen Abbau von STAT3 haben. Während für Interferon-γ-aktiviertes STAT1 eine Ubiquitin/Proteasom-vermittelte proteolytische Degradation beschrieben wurde (Kim und Maniatis 1996), konnte ein solcher Abbau von STAT3 nicht bestätigt werden (Heinrich et al. 1998). PGE₂ könnte durch die cAMP-abhängige Aktivierung einer spezifischen Tyrosin-Phosphatase STAT3 dephosphorylieren und damit die Spiegel an transkriptionell aktiven STAT3-Dimeren senken. Untersuchungen mit verschiedenen Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren lassen die Existenz eines Enzyms vermuten, das die Spiegel an phosphoryliertem STAT3 reguliert, das jedoch bisher nicht identifiziert wurde (Hague et al. 1995; David et al. 1993). Ob ein solcher Dephosphorylierungsprozess für die transkriptionelle Inaktivierung und/oder für den Transport aus dem Zellkern notwendig ist, ist noch unbekannt, ebenso wie die Mechanismen, die am STAT3-Kernexport selber oder an dessen Regulation beteiligt sind. Es wurden große Mengen inaktiver STAT-Proteine im Zellkern unstimulierter Zellen gefunden, was vermuten läßt, daß die STAT-Inaktivierung und der Kernexport nicht gekoppelt sind (Ram et al. 1996).



Abb. 36: PGE₂-vermittelte Hemmung der IL-6-stimulierten Synthese von Akutphase-Proteinen über die durch IL-6-induzierten G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R in Hepatocyten. Das proinflammatorische Cytokin IL-6 induziert in Hepatocyten (HC) die G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren EP2-R und EP4-R. Über diese beiden Rezeptoren kann PGE₂ cAMP-abhängig die IL-6-stimulierte Synthese des Akutphase-Proteins α_2 -Makroglobulin inhibieren, indem es die Spiegel an aktivem Tyrosinphosphoryliertem STAT3 senkt. ACY, Adenylatcyclase; IL-6, Interleukin-6; IL-6-R, IL-6-Rezeptor; STAT3, Signal Transducer and Activator of Transcription.

5.4 Modell der Prostanoid-Wirkungen in der Leber während einer Entzündung

Prostanoide werden Stimulus-abhängig im Rahmen lokaler oder systemischer Entzündungsreaktionen aus den Nichtparenchymzellen der Leber freigesetzt. Das Prostaglandin E_2 (PGE₂) ist dabei ein zentraler Modulator der hepatischen Entzündungsantwort. Die differentielle und Cytokin-modulierte Expression der Prostanoidrezeptoren erlaubt eine differenzierte und in der zeitlichen Abfolge variable Antwort der Leber auf PGE₂.

In der Initialphase der Entzündung, die wenige Minuten bis hin zu einer Stunde andauern kann, werden vorwiegend Prozesse über die konstitutiv exprimierten Prostanoidrezeptoren EP1-R, EP3-R und FP-R auf Hepatocyten, EP1-R, EP2-R und EP4-R sowie EP3-R auf Kupfferzellen, TP-R auf sinusoidalen Endothelzellen und IP-R auf Perisinusoidalzellen durch Prostanoide gesteuert.

So kommt es in der akuten Phase durch die Wirkung der Prostanoide über den EP1-R bzw. FP-R zu einer Freisetzung von Glucose aus Hepatocyten sowie über den TP-R der sinusoidalen Endothelzellen und den IP-R der Perisinusoidalzellen (Tab. 9) zu einer Veränderung der Flußrate und Umverteilung des Blutflusses in den Sinusoiden. Über den EP2-R und EP4-R wird die Produktion von Mediatoren der Entzündungsreaktion wie TNF α in Kupfferzellen beschränkt (Tab. 9). Über den EP4-R wird die Antigenpräsentation durch sinusoidale Endothelzellen limitiert (Tab. 9).

Zu späteren Zeitpunkten, d. h. im subakuten Verlauf der Entzündung, scheinen speziell nach der Cytokin-vermittelten Induktion der G_S-gekoppelten PGE₂-Rezeptoren auf Hepatocyten, PGE₂-vermittelte Rückkopplungsschleifen zur Hemmung der Cytokin-induzierten Synthese positiver Akutphase-Proteine während der Akutphase-Reaktion in den Vordergrund zu treten (Tab. 9).

Die konstitutiv exprimierten und die induzierbaren G_{s} -gekoppelten PGE_{2} -Rezeptoren auf Nichtparenchymzellen und Parenchymzellen scheinen somit eine gemeinsame Hauptfunktion zu haben: Die Einschränkung eventuell überschießender Abwehrreaktionen der Leber.

Tab. 9: Einschränkung eventuell überschießender Abwehrfunktionen der Leber über die G_S-gekoppelten Prostanoidrezeptoren EP2-R, EP4-R und IP-R auf Kupfferzellen (KC), sinusoidalen Endothelzellen (SEC), Perisinusoidalzellen (PSC) und Hepatocyten (HC) der Leber während einer Entzündung. DP-R, PGD₂-Rezeptor, EP2-R, PGE₂-Rezeptor-Subtyp 2; EP4-R, PGE₂-Rezeptor-Subtyp 4, IP-R, Prostacyclin-Rezeptor; IL-1, Interleukin-1; IL-6, Interleukin-6; LPS, Lipopolysaccharid; PAF, Plättchen-aktivierender Faktor; TNF α , Tumor Necrose Faktor α ,

Zelltyp	Rezeptor-Expression	Hauptfunktion
	Konstitutiv:	
KC:	EP2-R, EP4-R	\rightarrow Hemmung der LPS-
		abhängigen TNFα-Synthese
SEC:	EP4-R	\rightarrow Hemmung der
		Antigenpräsentation
		ightarrow Hemmung der IL-1- und PAF-
		Produktion
PSC:	IP-R	\rightarrow Hemmung der Endothelin-
		ausgelösten Kontraktion
	Induzierbar:	
HC:	EP2-R, EP4-R	ightarrow Hemmung der IL-6-
		ausgelösten Synthese von
		Akutphase-Proteinen
	DP-R	\rightarrow Wahrscheinlich keine Funktion

Literaturverzeichnis

- Akira S, Taga T und Kishimoto T (1993): Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol 54: 1-78
- Anbalagan K und Sadique J (1984): Role of prostaglandins in acute phase protein synthesis in inflammation. Biochem Med 31: 236-245
- Andus T, Geiger T und Hirano T (1987): Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN- β_2) regulates β -fibrinogen and albumin mRNA levels in FAO-9 cells. FEBS Lett 221: 18-22
- Anundi I, Lahteenmaki T, Rundgren M, Moldens P und Lindros KO (1993): Zonation of acetaminophen metabolism and cytochrome P450 2E1-mediated toxicity studied in isolated periportal and perivenous hepatocytes. Biochem Pharmacol 45: 12151-12159
- Aoki J, Katoh H, Yasui H, Yamaguchi Y, Nakamura K, Hasegawa H, Ichikawa A und Negishi M (1999): Signal transduction pathway regulating prostaglandin EP3 receptorinduced neurite retraction: requirement for two different tyrosine kinases. Biochem J 340: 365-369
- Arola L, Palou A, Remesar X, Herrera E und Alemany M (1980): Effect of stress and sampling site on metabolic concentration in rat plasma. Arch Int Physiol Biochim 88: 99-105
- **Athari A, Hänecke K und Jungermann K (1992):** Prostaglandin F_{2α} and D₂ release from primary Ito cell cultures after stimulation with noradrenaline and ATP but not adenosine. Hepatology 20: 142-148
- **Beno DW, Espinal R, Edelstein BM und Davis BH (1993):** Administration of prostaglandin E₁ analog reduces rat hepatic and Ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury. Hepatology 17: 707-714
- **Beno DW, Rapp UR und Davis BH (1994):** Prostaglandin E suppression of platelet-derivedgrowth-factor-induced Ito cell mitogenesis occurs independent of raf perinuclear translocation and nuclear proto-oncogene expression. Biochim Biophys Acta 1222: 292-300
- Bhatnagar R, Schirmer R, Ernst M und Decker K (1981): Superoxide release by zymosanstimulated rat Kupffer cells in vitro. Eur J Biochem 119: 171-175
- Bhattacharya M, Peri K, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR und Chemtob S (1999): Localization of functional prostaglandin E₂ receptor EP3 and EP4 in the nuclear envelope. J Biol Chem 274: 15719-15724
- Blaschke V, Jungermann K und Püschel GP (1996): Exclusive expression of the G_Slinked prostaglandin E₂ receptor subtype 4 and 2 mRNA in U-937 cells. FEBS Lett 394: 39-43
- Blouin A, Bolender RP und Weibel ER (1977): Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. J Cell Biol 72: 441-455
- Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R und Wisse E (1986): Quantitations, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. Hepatology 6: 718-722
- Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B und Wisse E (1992): Liver cell heterogeneity: Functions of non-parenchymal cells. Enzyme 46: 155-168

- **Böer U, Neuschäfer-Rube F, Möller U und Püschel GP (2000):** Requirement of Nglycosylation of the prostaglandin E₂ receptor EP3β for correct sorting to the plasma membrane but not for correct folding. Biochem J 350: 839-847
- **Bradford MM (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254
- **Brass EP und Garrity MJ (1985):** Effect of E-series prostaglandins on cyclic AMPdependent and -independent hormone-stimulated glycogenolysis in hepatocytes. Diabetes 34: 291-294
- Brass EP und Garrity MJ (1990): Structural specificity for prostaglandin effects on hepatocyte glycogenolysis. Biochem J 267: 59-62
- Bronstad GO und Christoffersen T (1981): Inhibitory effect of prostaglandins on the stimulation by glucagon and adrenaline of formation of cyclic AMP in rat hepatocytes. Eur J Biochem 117: 369-374
- **Brower A, Barelds RJ und Knook DL (1984):** Centrifugal separation of mammalian cells. Rickwood D (ed.): Centrifugation: a practical approach. 183-218
- Burt AD, Path MRC, LeBail B, Balabaud C und Bioulac-Sage P (1993): Morphologic investigation of sinusoidal cells. Semin Liver Dis 13: 21-39
- Busam KJ, Bauer TM, Bauer J, Gerok W und Decker K (1990): Interleukin-6 release by rat liver macrophages. J Hepatol 11: 367-373
- **Callery MP, Mangino MJ, Kamei T und Flye MW (1990):** Interleukin-6 production by endotoxin-stimulated Kupffer cells is regulated by prostaglandin E₂. J Surg Res 48: 523-527
- Casteleijn E, Kuiper J, Van Rooij HC, Kamps JA, Koster JF und Van Berkel TJ (1988): Endotoxin stimulates glycogenolysis in the liver by means of intercellular communication. J Biol Chem 263: 6953-6955
- Casteleijn E, Kuiper J, Van Rooij, Koster JF und Van Berkel TJ (1988a): Hormonal control of glycogenolysis in parenchymal liver cells by Kupffer and endothelial cells. J Biol Chem 263: 2699-2703
- Chen C und Okayama H (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol Cell Biol 7: 2745-2752
- Chen C und Okayama H (1988): Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. Biotechniques 6: 632-638
- Christ B, Nath A, Heinrich PC und Jungermann K (1994): Inhibition by recombinant human interleukin-6 of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and of the insulin-dependent induction of glucokinase gene expression in cultured rat hepatocytes: regulation of gene transcription and messenger RNA degradation. Hepatology 20:1577-1583
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N und Knopf JL (1991): A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. Cell 65: 1043-1051
- **Coleman RA, Smith WL und Narumiya S (1994):** International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. Pharmacol Rev 46: 205-229

- **David M, Grimley PM, Finbloom DS und Larner AC (1993):** A nuclear tyrosine phosphatase downregulates interferon-induced gene expression. Mol Cell Biol 13: 7515-7521
- Deak T, Meriwether JL, Fleshner M, Spencer RL, Abouhamze A, Moldawer LL und Grahn RE (1997): Evidence that brief stress may induce the acute phase response in rats. Am J Physiol 273: R1998-R2004
- Dini L, Lentini A, Diez G, Rocha M, Falasca L, Serafino L und Vidal-Vanaclocha F (1995): Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. J Cell Sci 108: 967-973
- **Dieter P, Hempel U, Kamionka S, Kolada A, Malessa B, Fitzke E und Tran-Thi TA** (1999): Prostaglandin E₂ affects differently the release of inflammatory mediators from resident macrophages by LPS and muramy tripeptides. Med Inflamm 8: 295-303
- **Dieter P, Peters T, Schulze-Specking A und Decker K (1989):** Independent regulation of thromboxane and prostaglandin synthesis in liver macrophages. Biochem Pharmacol 38: 1577-1581
- **Dohlmann HG, Thorner J, Caron MG und Lefkowitz RJ (1991):** Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. Annu Rev Biochem 60: 653-688
- **Dower WJ, Miller JF und Ragsdale CW (1988):** High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucl Acids Res 16: 6127-6145
- **Duhé RJ und Farrar WL (1998):** Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. J Interferon Cytokine Res 18: 1-15
- Eyhorn S, Schlayer HJ, Henninger HP, Dieter P, Hermann R, Woort-Menker M, Becker H, Schaefer HE und Decker K (1988): Rat hepatic sinusoidal endothelial cells in monolayer culture. Biochemical and ultrastructural characteristics. J Hepatol 6: 23-35
- Fennekohl A, Schieferdecker HL, Jungermann K und Püschel GP (1999): Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. J Hepatol 28: 38-47
- Filkins JP (1985): Monokines and the metabolic pathophysiology of septic shock. Fed Proc 44: 300-304
- **Gauldie J, Richards C, Harnish D, Landsdorp P und Baumann H (1987):** Interferon β2/Bcell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute-phase protein response in liver cells. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7251-7255
- Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hermann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC und Graeve L (1996): Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. J Biol Chem 271: 12991-12998
- Giles H, Bolofo ML, Lydford SJ und Martin GR (1991): A comparative study of the prostanoid receptor profile of 9 alpha 11 beta-prostaglandin F₂ and prostaglandin D₂. Br J Pharmacol 104: 541-549
- Ginot F, Decaux JF, Cognet M, Berbar T, Levrat F, Kahn A und Weber (1989): Transfection of hepatic genes into adult hepatocytes in primary culture and their tissuespecific expression. Eur J Biochem 180: 289-294
- **Gordon AH und Koj A (1985):** The acute-phase response to injury and infection. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier

- **Goss JA, Mangino MJ, Callery MP und Flye MW (1993):** Prostaglandin E₂ downregulates Kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. Am J Physiol 264: G601-G608
- **Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL und Schreiber RD (1994):** Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). EMBO J 13: 1591-1600
- **Gressner AM (1991):** Liver fibrosis: Perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. Eur J Clin Chem Clin Biochem 29: 293-311
- **Grewe M, Duyster J, Dieter P, Henniger H, Schulze-Specking A und Decker K (1992):** Prostaglandin D₂ and E₂ synthesis in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by lipopolysaccharide and phorbol ester. Biol Chem Hoppe-Seyler 373: 655-664
- **Grötzinger J, Kurapkat G, Wollmer A, Kalai M und Rose-John S (1997):** The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. Proteins 27: 96-107
- Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich PC und Stark GR (1995): A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. EMBO J 14: 1421-1429
- Häussinger D, Lamers WH und Moorman AFM (1992): Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. Enzyme 46: 72-93
- Harbrecht BG, McClure EA, Simmons RL und Billiar TR (1995): Prostanoids inhibit Kupffer cell nitric oxide synthesis. J Sug Res 58: 625-629
- Harbrecht BG, Kim YM, Wirant EA, Simmons RL und Billiar TR (1997): Timing of prostaglandin exposure is critical for the inhibition of LPS- or IFN-gamma-induced macrophage NO synthesis by PGE₂. J Leukoc Biol 61: 712-720
- Haque SJ, Flati V, Deb A und Williams BRG (1995): Roles of protein-tyrosine phosphatases in Stat1a-mediated cell signaling. J Biol Chem 270: 25709-25714
- Heim MH, Kerr IM, Stark GR und Darnell Jr. JE (1995): Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. Science 267: 1347-1349
- Heinrich PC, Castell JV und Andus T (1990): Interleukin-6 and the acute-phase response. Biochem J 265: 621-636
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F und Graeve L (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem J 334: 297-314
- Hendriks HFJ, Verhoofstad WA, Brouwer A, De Leeuw AM und Knook DL (1985): Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. Exp Cell Res 160: 138-149
- Hespeling U, Püschel GP, Jungermann K, Götze O und Zwirner J (1995): Stimulation of glycogen phosphorylase in rat hepatocytes via prostanoid release from Kupffer cells by recombinant rat anaphylatoxin C5a but not by native human C5a in hepatocyte/Kupffer cell co-cultures. FEBS Lett 372: 108-112
- **Hirano H (1989):** Microsequence analysis of winged bean seed proteins electroblotted from two-dimensional gel. J Protein Chem 8: 115-130
- Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F und Matsuoka T (1999): Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin receptor subtype EP(2). Proc Natl Acad Sci USA 96: 10501-10506

- Hoffmann R, Henninger HP, Schulze-Specking A und Decker K (1994): Regulation of interleukin-6 receptor expression in rat Kupffer cells: modulation by cytokines, dexamethasone and prostaglandin E₂. J Hepatol 21: 543-550
- Holtslag JC, Moshage HJ, van Pelt JF, Kleuskens JA, Gribnau FW und Yap SH (1988): Prostaglandins E₂ and F₂ alpha are not involved in the monocytic-product (interleukin-1)induced stimulation of hepatic fibrinogen synthesis in rats. Clin Sci 74: 477-483
- Horvath CM, Wen Z und Darnell JE (1995): A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. Genes Dev 9: 984-994
- **Ihle JN (1995):** The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. Adv Immunol 60: 1-35
- Irie A, Sugimoto Y, Namba T, Harazono A, Honda A, Wataba A und Negishi M (1993): Third isoform of the prostaglandin E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. Eur J Biochem 217: 313-318
- Ishiguro S, Arii S, Monden K, Fujita S, Nakamura T und Niwano M (1995): Involvement of thromboxane A₂-thromboxane A₂ receptor system of the hepatic sinusoid in pathogenesis of cold preservation/reperfusion injury in the rat liver graft. Transplantation 56:957-961
- **Iwai M, Gardemann A, Püschel GP und Jungermann K (1988):** Potential role for prostaglandin F₂ alpha, D₂, E₂ and thromboxane A₂ in mediating the metabolic and hemodynamic actions of sympathetic nerves in perfused rat liver. Eur J Biochem 175: 45-50
- Jungermann K und Kietzmann T (1996): Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in the liver. Annu Rev Nutr 16: 179-203
- Jungermann K und Thurman RG (1992): Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. Enzyme 46: 33-58
- Kaptein A, Paillard V und Saunders M (1996): Dominant negative Stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. J Biol Chem 271: 5961-5964
- Katsuyama M, Ikegami R, Karahashi H, Amano F, Sugimoto Y und Ichikawa A (1998): Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. Biochem Biophys Res Commun 251: 727-731
- Kawada N, Klein H und Decker K (1992): Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. Biochem J 285: 367-371
- Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H und Decker (1993): The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. Eur J Biochem 213: 815-823
- Kawada N, Harada K, Ikeda K und Kaneda K (1996): Morphological study of endothelin-1induced contraction of cultured hepatic stellate cells on hydrated collagen gels. Cell Tissue Res 286: 477-486
- Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y und Narumiya S (1997): Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. Br J Pharmacol 122: 217-224
- **Kim TK und Maniatis T (1996):** Regulation of interferon-γ-activated STAT1 by the ubiquitinproteasome pathway. Science 273: 1717-1719
- Klasing KC (1988): Nutritional aspects of leukocytic cytokines. J Nutr 118: 1436-1446

- Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, Lohse A und Gerken G (1999): Endotoxin down-regulates T-cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. J Immunol 162: 1401-1407
- Knolle PA und Gerken G (2000): Local control of the immune response in the liver. Immunol Rev 174: 21-34
- Knook DL, Blansjaar N und Sleyster EC (1977): Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from rat liver. Exp Cell Res 109: 317-329
- Knook DL und Sleyster EC (1980): Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content. Biochem Biophys Res Commun 96: 250-257
- Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart MK, O'Shea J, Tubbs R, Rybicki L, Bukowski R und Finke J (1999): Downregulation of JAK3 Protein Levels in T-Lymphocytes by prostaglandin E₂ and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: Impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. Blood 93: 2308-2318
- Krones A (1999): Zonierung des Glucagon-, Insulin- und α1B-adrenergen Rezeptors in Leber. Differentielle Expression auf den verschiedenen Zelltypen der Leber und Modulation der Genexpression durch Glucose und O₂ in kultivierten Rattenhepatocyten. Dissertationsschrift zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität, Göttingen
- Kuiper J, Zijlstra FJ, Kamps JA und van Berkel TJ (1988): Identification of prostaglandin D₂ as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells. Biochim Biophys Acta 959: 143-152
- Kushner I (1982): The phenomenon of the acute-phase response. Ann NY Acad Sci 389: 39-49
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Limaos EA, Ribeiro EB und Gordon AH (1985): Effect of endogenous pyrogen, corticosteroides and inhibitors of prostaglandins and leukotrienes on the plasma concentrations of haptoglobin and fibrinogen in rats. Braz J Med Biol Res 18: 549-555
- Lohse AW, Knolle PA, Bilo K, Uhrig A, Waldmann C und Ibe M (1996): Antigenpresenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. Gastroenterology 110: 1175-1181
- Magnusson S und Berg T (1989): Extremely rapid endocytosis mediated by the mannosespecific receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells. Biochem J 257: 651-656
- Melien O, Winsnes R, Refsnes M, Gladhaug IP und Christoffersen T (1988): Pertussis toxin abolishes the inhibitory effects of prostaglandins E₁, E₂, I₂ and F₂ alpha on hormone-induced cAMP accumulation in cultured hepatocytes. Eur J Biochem 172: 293-297
- Memon RA, Feingold KR und Grunfeld C (1994): The effect of cytokines on intermediary metabolism. Endocrinologist 4: 56-63
- **Meredith MJ (1988):** Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture. Cell Biol Toxicol 4: 405-425
- Misra UK, Bradford BU, Handler JA und Thurman RG (1992): Chronic ethanol treatment induces H₂O₂ production selectively in pericentral regions of the liver lobule. Alcohol Clin Exp Res 16: 839-842

- Mizoguchi Y, Ichikawa Y, Kawada N, Kobayashi K und Morisawa S (1991): The effect of lipo-prostaglandin E₁ on the production of interleukin 1 and platelet activating factor by hepatic sinusoidal endothelial cells in mice. Osaka City Med J 37: 69-78
- Moshage H (1997): Cytokines and the hepatic acute phase response. J Pathol 181: 257-266
- Murakami N, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamguchi M, Taga T und Kishimoto T (1991): Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp 130 is conserved in the cytokine receptor superfamily. Proc Natl Acad Sci USA 88: 11349-11353
- Narumiya S, Hirata N, Namba T, Hayashi Y, Ushikubi F, Sugimoto Y, Negishi M und Ichikawa A (1993): Structure and function of prostanoid receptors. J Lipid Mediat 6: 155-161
- **Neuschäfer-Rube, Püschel GP und Jungermann K (1993):** Characterization of prostaglandin F₂ alpha-binding sites on rat hepatocyte plasma membranes.
- Nishigaki N, Negishi M und Ichikawa A (1996): Two G_S-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. Mol Pharmacol 50: 1031-1037
- Noguchi K, Iwasaki K, Shitashige M und Ichikawa I (1999): Prostaglandin E₂ receptors of the EP2 and EP4 subtypes downregulate tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human gingival fibroblasts. J Periodontal Res 34: 478-485
- Oda M, Kaneko H, Suematsu M, Suzuki H, Kazemoto S, Honda K, Yonei Y und Tsuchiya M (1993): A new aspect of the hepatic microvasculature: Electron microscopic evidence for the presence of Ito cells around portal and hepatic venules as pericytes. In: Liver microcirculation and hepatobiliary function. Messmer K, Menger MD (eds.), 25-39. Basel: Karger
- **Okumura T, Sago T, Saito K (1988):** Pertussis toxin blocks an inhibition of hormonestimulated glycogenolysis by prostaglandin E₂ and its analogue in cultured hepatocytes. Prostaglandins 36 :463-75
- Parker BA und Stark GR (1979): Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. J Virol 31: 360-369
- Pasco DS und Fagan JB (1989): Efficient DNA-mediated gene transfer into primary cultures of adult rat hepatocytes. DNA 8: 535-541
- **Pellegrini S und Dusanter-Fourt I (1997):** The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). Eur J Biochem 248: 615-633
- Peters T, Gaillard T und Decker K (1990): Tumor necrosis factor alpha stimulates prostaglandin but not superoxide synthesis in rat Kupffer cells. Eicosanoids 3: 115-120
- **Peters T, Karck U und Decker K (1990):** Interdependence of tumor necrosis factor, prostaglandin E₂, and protein synthesis in lipopolysaccharide-exposed rat Kupffer cells. Eur J Biochem 191: 583-589
- Püschel GP, Hespeling U, Oppermann M und Dieter P (1993): Increase in prostanoid formation in rat liver macrophages (Kupffer cells) by human anaphylatoxin C3a. Hepatology 18: 1516-1521

- Püschel GP, Kirchner C, Schröder A und Jungermann K (1993a): Glycogenolytic and antiglycogenolytic prostaglandin E₂ actions in rat hepatocytes are mediated via different signalling pathways. Eur J Biochem 218: 1083-1089
- **Püschel GP und Christ B (1994):** Inhibition by PGE₂ of glucagon-induced increase in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA and acceleration of mRNA degradation in cultured rat hepatocytes. FEBS Lett 351: 353-356
- Püschel GP, Neuschäfer-Rube F, de Vries C, Hänecke K, Nolte A, Kirchner C und Schröder A (1996): Characterization and molecular cloning of hepatocyte prostaglandin receptors possibly involved in the nerve stimulation-dependent increase in hepatic glucose output. In: Shimazu T (ed.), Liver innervation. London: John Libbey & Comp 87-94
- Ram PA, Park SH, Choi HK und Waxman DJ (1996): Growth hormone activation of Stat1, Stat3, Stat5 in rat liver. J Biol Chem 271: 5929-5940
- Ramadori G, Rieder H und Knittel T (1993): Biology and pathobiology of sinusoidal liver cells. In: Hepatic transport and bile secretion: Physiology and pathophysiology. Tavoloni N, Berk PD (eds.), 83-102
- Reinstein LJ, Lichtman SN, Currin RT, Wang J, Thurman RG und Lemasters JJ (1994): Suppression of lipopolysaccharide-stimulated release of tumor necrosis factor by adenosine: evidence for A₂ receptors on rat Kupffer cells. Hepatology 19: 1445-1452
- Refsnes M, Dajani OF, Sandnes D, Thoresen GH, Rottingen JA, Iversen JG und Christofferson T (1995): On the mechanisms of the growth-promoting effect of prostaglandins in hepatocytes: the relationship between stimulation of DNA-synthesis and signaling mediated by adenylyl cyclase and phosphoinositide-specific phospolipase C. J Cell Physiol 164: 465-473
- Revhaug A, Michie HR, Manson JM, Watters JM, Dinarello CA, Wolff SM und Wilmore DW (1988): Inhibition of cyclooxygenase attenuates the metabolic response to endotoxin in humans. Arch Surg 123: 162-170
- Ridley AJ und Hall A (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress. Cell 70: 389-399
- Rippe RA, Brenner DA und Leffert HL (1990): DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture. Mol Cell Biol 10: 689-695
- **Roitt I, Brostoff J und Male D (1996):** Immunology, 4th edition. Mosby, imprint of Times Mirror International Publishers Limited; London, England
- Samuelsson B, Goldyne M, Granström E, Hamberg M, Hammarström S und Malmsten C (1978): Prostaglandins and Thromboxanes. Annu Rev Biochem 47: 997-1029
- Sasse D (1992): Liver architecture. Enzyme 46: 8-32
- Schieferdecker HL, Pestel S, Püschel GP, Götze O und Jungermann K (1999): Increase by anaphylatoxin C5a of glucose output in perfused rat liver via prostanoids derived from nonparenchymal cells: direct action of prostaglandins and indirect action of thromboxane A2 on hepatocytes. Hepatology 30: 454-461
- Segi E, Sugimoto Y. Yamasaki A, Aze Y, Oida H, Nishimura T, Murata T, Matsuoka T, Ushikubi F, Hirose M, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A (1998): Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun 246: 7-12

- Shuai K, Stark GR, Kerr IM und Darnell Jr. JE (1993): A single phosphotyrosine residue of Stat1 required for gene activation by interferon-gamma. Science 261: 1744-1746
- Smith WL und Marnett LJ (1991): Prostglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. Biochim Biophys Acta 1083: 1-17
- Stahl N, Farrugella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell Jr. JE und Yancopoulos GD (1995): Choice of STATs and other substrates specified by modulated tyrosine-based motifs in cytokine receptors. Science 267: 1349-1353
- Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T und Akira S (1998): Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: Generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. J Immunol 161: 4652-4660
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I und Akira S (1999): Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis im mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. Immunity 10: 39-49
- **Thurman RG, Kauffman FC und Baron J (1986):** Biotransformation and zonal toxicity. In: Regulation of hepatic metabolism. Intra- and intercellular compartmentation. Thurman RG, Kaufman FC, Jungermann K (eds.), 321-382. New York: Plenum
- **Tran-Thi TA, Gyufko K, Häussinger D und Decker K (1988a):** Net prostaglandin release by perfused rat liver after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate. J Hepatol 6: 151-157
- **Tran-Thi TA, Häussinger D, Gyufko K und Decker K (1988b):** Stimulation of prostaglandin release by Ca²⁺-mobilizing agents from the perfused rat liver. A comparative study on the action of ATP, UTP, phenylepinephrine, vasopressin and nerve stimulation. Biol Chem Hoppe-Seyler 369: 65-68
- **Tzung SP, Gaines KC, Lance P, Ehrke MJ und Cohen SA (1990):** Suppression of hepatic lymphokine-activated killer cell induction by murine Kupffer cells and hepatocytes. Hepatology 12: 644-652
- Van Berkel TJC, Kuiper F, Vonk R und Bakkeren HF (1991): In vivo evidence for reverse cholesterol transport from liver endothelial cells to parenchymal cells and bile by high density lipoprotein. In: Cells of the Hepatic Sinusoid. Wisse E, Knook DL, McCuskey RS (eds.), Vol. 3: 483-488. The Kupffer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands
- Vom Dahl S, Wettstein M, Gerok W und Häussinger D (1990): Stimulation of release of prostaglandin D₂ and thromboxane B₂ from perfused rat liver by extracellular adenosine. Biochem J 270: 39-44
- Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J und Darnell Jr. JE (1996): DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH₂-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. EMBO J 15: 5616-5626
- Wang XE, Watanabe S, Oide H, Hirose M, Itatsu T, Osada T, Takazakura Y (1998): Hepatic stellate cell contraction is inhibited by lipo-prostaglandin E₁ in vitro. J Gastroenterol Hepatol 13 Suppl: S14-S18
- Waymack JP und Mason AD Jr. (1989): Effect of prostaglandin E in multiple experimental models. III. Effect on response to septic challenge. J Burn Care Rehabil 10: 481-485
- Wegenka UM, Buschmann J, Lütticken C, Heinrich PC und Horn F (1993): Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. Mol Cell Biol 13: 276-288

- Whicher JT, Bell AM, Martin MF, Marshall LA und Dieppe PA (1984): Prostaglandins cause an increase in serum acute-phase proteins in man, which is diminished in systemic sclerosis. Clin Sci 66: 165-171
- Wincek TJ, Hupka AL und Sweat FW (1975): Stimulation of adenylate cyclase from isolated hepatocytes and Kupffer cells. J Biol Chem 250: 8863-8873
- Wisse E, Van't Noordende JM, Van Der Meulen J und Daems WT (1976): The Pit cell: Description of a new type of cell occuring in rat liver sinusoids and peripheral Blood. Cell Tissue Res 173: 423-435
- Xu X, Sun YL und Hoey T (1996): Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. Science 273: 794-797
- Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T und Kishimoto T (1988): Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. Science 241: 825-828
- Zhang X, Blenis J, Li HC, Schindler C und Chen-Kiang S (1995): Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. Science 267: 1990-1994
- Zhong Z, Wen Z und Darnell Jr. JE (1994): Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. Proc Natl Acad Sci USA 91: 4806-4810

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kurt Jungermann für die Überlassung des Dissertationsthemas und die zahlreichen anregenden und hilfreichen Diskussionen.

Prof. Dr. Gerhard P. Püschel, dem Betreuer dieser Arbeit, danke ich ganz besonders für seine ständige Hilfsbereitschaft, den vielen Ratschlägen und anregenden Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Rüdiger Hardeland danke ich für die Übernahme der Korreferentenschaft.

Ulrike Böer, Frank Neuschäfer-Rube, Manuela Kuna, Matthias Rehwald, Ulrike Möller, Christiane Spillner und Eva Engemaier möchte ich für die große Unterstützung während dieser Arbeit, das herzliche Miteinander und den vielen Spaß meinen lieben Dank aussprechen.

Den Mitarbeitern der Abteilung von Prof. Dr. Kurt Jungermann sowie den Mitgliedern der Werkstatt möchte ich für ein schönes Arbeitsklima, und daß sie immer behilflich waren, danken. Hier möchte ich besonders Henrike Schieferdecker, Milena Koleva (herzlichen Dank nochmals für die Hepatocyten!), Claudia Mäck und Annegret Nath danken, daß sie mir so freundlichen Unterschlupf in ihrem Labor gewährt haben.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meiner Familie und besonders Henning, die durch ihr ständiges Entgegenkommen und die aufmunternden Worte, und daß sie immer für mich da waren, auch wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Angaben zur Person:		
Name:	Alexandra Fennekohl	
Geburtstag:	8. August 1970	
Geburtsort:	Laatzen/Hannover	
Staatsangehörigkeit:	Deutsch	
Schulbildung:		
1977-1983:	Besuch der Marien-Grundschule in Kleve und der Grund- und Hauptschule in Bispingen	
1983-1991:	Besuch des Gymnasiums Soltau mit Abschluß Abitur im Mai 1991	
Studium:		
Oktober 1991-Oktober 1993:	Grundstudium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen	
Oktober 1993:	Vordiplomprüfung in den Fächern Botanik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie	
1993-1996:	Hauptstudium der Biologie mit Schwerpunkt Biochemie an der Georg-August-Universität in Göttingen	
Juni 1996:	Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Humangenetik und Chemie	
September 1996-August 1997:	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie in Göttingen in der Abteilung von Prof. Dr. Kurt Jungermann mit dem Titel "Differentielle Expression von Prostanoidrezeptoren in Parenchym- und Nichtparenchymzellen der Rattenleber"	
Oktober 1997:	Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie in Göttingen in der Abteilung von Prof. Dr. K. Jungermann mit dem Titel "Einschränkung hepatischer Abwehrreaktionen während einer Entzündung durch Prostaglandin E ₂ über G_{s} -Protein-gekoppelte Prostaglandin E ₂ -Rezeptoren"	
Januar 2000:	Auszeichnung mit dem Forschungspreis 2000 der German Association for the Study of the Liver (GASL)	
ptember 2001: Abgabe der vorliegenden Dissertation		